

薬物担体としてのアルブミン
小球体に関する研究

杉 林 堅 次

薬物担体としてのアルブミン
小球体に関する研究

杉 林 堅 次

目 次

緒 論	1
第 1 章 アルブミン小球体の調製と一般的性質	
第 1 節 緒 言	4
第 2 節 実験材料及び方法	4
第 3 節 実験結果	7
第 4 節 小括と考察	16
第 2 章 アルブミン小球体の生体内分布	
第 1 節 緒 言	18
第 2 節 実験材料及び方法	18
第 3 節 実験結果	22
第 4 節 小括と考察	35
第 3 章 Ehrlich 腹水癌及び固型癌に対する 5-fluorouracil 含有小 球体の抗腫瘍効果	
第 1 節 緒 言	37
第 2 節 実験材料及び方法	38
第 3 節 実験結果	40
第 4 節 小括と考察	51
第 4 章 AH7974 転移肝癌に対する adriamycin 含有小球体の抗腫瘍効果	
第 1 節 緒 言	53
第 2 節 実験材料及び方法	53
第 3 節 実験結果	55
第 4 節 小括と考察	62
第 5 章 磁性アルブミン小球体による臓器選択性の増強	
第 1 節 緒 言	63
第 2 節 実験材料及び方法	64
第 3 節 実験結果	68
第 4 節 小括と考察	89
第 6 章 総括及び考察	91
謝 辞	95
文 献	96

緒 論

癌の化学療法は、外科的療法、放射線療法及び免疫療法と並んで臨床治療において重要な位置を占めている。もちろん現在、癌の治療法は、これを早期に発見し、早期に剔出することが最善とされているが、手術の出来ない癌や再発防止において化学療法の重要性はますます増加しており、また臓器のあるべき姿をそのままに治癒させることは、治療の究極的な目的である。

しかしながら、現在臨床治療に使用されている制癌剤の多くが、その作用点において腫瘍細胞と正常細胞とで同一の点が多く、それ故正常細胞の生存にも影響を与える。このことが癌の化学療法そのものの有用性に制限を加えることとなっている。制癌剤も他の薬物と同様にその物理化学的性質に依存して程度の差はあるが、体内に入った後各組織へ分布する。この分布を投与法の改善、制癌剤の薬剤-製剤学的修飾等によって腫瘍部位に可能な限り局在させることが出来るならば、制癌剤のもつ宿主に対する副作用を低下させることが可能となる。

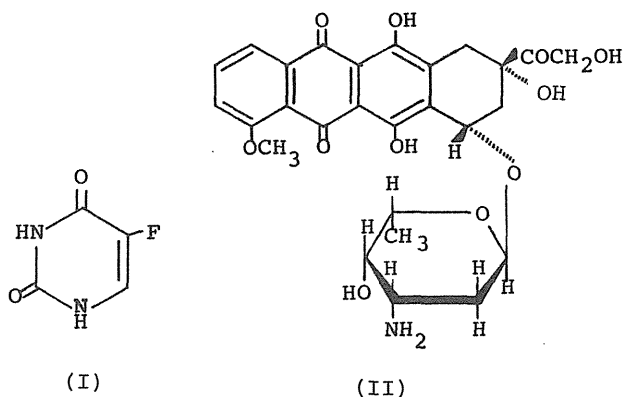
この見地にたって近年薬物担体 (drug-carrier) を利用し、薬物を癌組織に局所的かつ優先的に集中させ (targeting)、あわせて長期間有効な薬物レベルを維持する試みがなされるようになった。¹⁾ Table I は “Targeting of drugs” と称する Gregoriadis の総説²⁾から引用したものである。

Table I Drug Carriers in Biology and Medicine

Types	Carriers
Macromolecules	DNA Dextran
Cells	Erythrocytes
Synthetic system (non-biodegradable)	Nylon Microcapsules Polyacrylamide Gel
Synthetic system (biodegradable)	Liposomes Lactic Acid Polymers Multiple Emulsions Albumin Microspheres

これら薬物担体のうち特にリポゾーム（脂質小胞体）についての研究は数多くなされており、^{3, 4)} リポゾームを静脈内投与すると肝臓や脾臓等の細網内皮系に優先的に取り込まれることや、^{5, 6)} 制癌剤を内包したまま細胞内に取り込まれる機構（endocytosis）に関しても研究が行なわれている。^{7, 8)} また Trouet ら^{9, 10)} はダウノマイシンやアドリアマイシンがデオキシリボ核酸(DNA)と強く結合し、この complex が薬物単独に比べ正常細胞への分布が少なく毒性が低くなることを示している。この DNA-complex は endocytosis による取り込みが容易であり、かつ細胞内のライソゾームで消化される “lysosomotropic agent” として最初に提唱されたものである。更に乳酸とグリコール酸の copolymer に含有された薬物はラット腹腔内に投与すると、copolymer のゆっくりした分解につれて薬物が持続的に放出され、その徐放性が優れていることが報告されている。¹¹⁾ これらの実験からある種の薬物担体を用いた時、制癌剤の腫瘍部位への局在化並びにその部位における持続放出が達成でき、癌臨床治療における化学療法の有用性が著しく増加する可能性が生じる。

一方アルブミン小球体は放射線医学の領域ですでに肝臓や肺のスキャンニング剤として用いられており^{12, 13)} 更に血流量の見積りや¹⁴⁾ 血しょう量の測定¹⁵⁾ にも応用されている。これらの報告から明らかなように、アルブミン小球体は放射標識物質をしっかり保持し、粒子径を調節することで各部位のスキャンニング剤として利用されている。従って制癌剤を始めとする薬物の保持能もすぐれ、粒子径によって体内分布がコントロール出来ることが予想される。更に Kramer ら^{16, 17)} は *in vitro* で HeLa 細胞や glioblastoma 細胞にアルブミン小球体が選択的に取り込まれると報告していることから、この小球体のすぐれた特性を利用すれば、癌化学療法において薬物担体としての応用が期待できるものと考えられる。



そこで著者はアルブミン小球体の薬物担体としての機能を試験するため、モデル薬物として制癌剤である 5-フルオウラシル(I) (以下 5-FU と略記する) とアドリアマイシン(II) (以下 ADM と略記する) を選び、静注後の体内分布、*in vitro* 及び Ehrlich 腹水癌マウスの腹腔内における薬物放出を測定し、更にその選択的体内分布と徐放性から、胃癌手術時の肝転移癌を想定した実験腫瘍を用いて抗腫瘍効果を検討した。また、マグネタイトを含有したアルブミン小球体を調製し、磁気誘導によって強制的に薬物の体内分布を変化させて、新しい薬物担体としての有用性を示唆した。

第 1 章

アルブミン小球体の調製と一般的性質¹⁸⁾

第 1 節 緒 言

薬物担体となるものはそれ自体無毒であり、生体が代謝処理しうる (biodegradable) ものであることが望まれる。また薬理効果を十分に発揮するために、含有している薬物を徐々に放出することが望ましい。

本章においては、アルブミン小球体がこれら薬物担体としての諸条件を満足するかどうかを検討するため、その調製法、物理化学的性質、毒性、*in vitro* における薬物放出、更には生体内における小球体からの薬物遊離に影響を与える要因に関して実験を行った。

第 2 節 実験材料及び方法

実験材料：小球体調製に用いた牛血清アルブミン (BSA) (Fr. V, Powder) は生化学工業から得た。含有薬物として用いた 5-FU と ADM は協和醗酵より分与されたものを使用した。蛋白分解酵素はプロテアーゼ (プロナーゼ[®], 1.17×10^6 trypsin unit/g, 科研化学) を用いた。植物油としては綿実油を選んだ。非イオン性界面活性剤である Span 85 (HLB 1.8) と polysorbate 80 (同 16.7) は和光純薬から購入した。他の試薬は全て特級品を用いた。

アルブミン小球体調製法：アルブミン小球体の調製はスキヤニング剤として応用していた臨床放射線学の研究者らの方法を修飾した。^{13,19)} すなわちまず牛血清アルブミンと薬物 (5-FU または ADM) の混合液を調製する。5-FU の場合はアルブミン (250 mg) と 5-FU (250 mg) を 5-FU の溶解補助剤であるトリスアミノメタン溶液 (0.7 M) 1 ml

に懸濁させる。ADMの場合はアルブミン(250 mg/ml)とADM(100 mg/3 ml)の水溶液を別々に調製しておき混合する。次にこのアルブミン-薬物混液をSpan 85を10%(v/v)含む綿実油中(100 ml)に入れ、ガラススターラー(東京理化機械, モデルMS-75)で攪拌(2500 rpm, 10 min)後、超音波破碎機(日本精機製作所, G-50022-4)を用いて乳化(100 W, 30 min)し、油中水型(w/o型)のマイクロエマルジョンとする。これをグリセリン油浴にて、各設定温度で固化させて小球体とする。以後エーテル等の有機溶媒を使って油分を除去し、デシケータ中で乾燥保存する。

この実験装置をFig. 1に、概略をChart 1に示す。

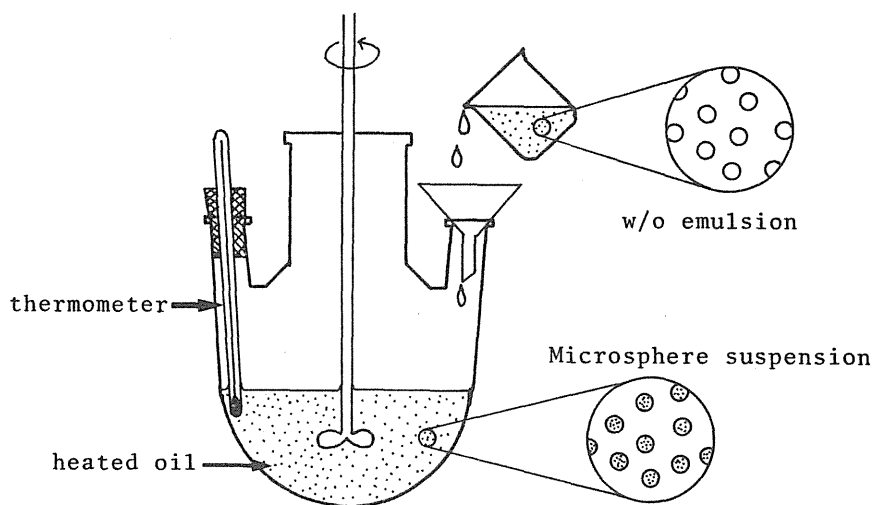


Fig. 1 Apparatus for Preparing Albumin Microspheres

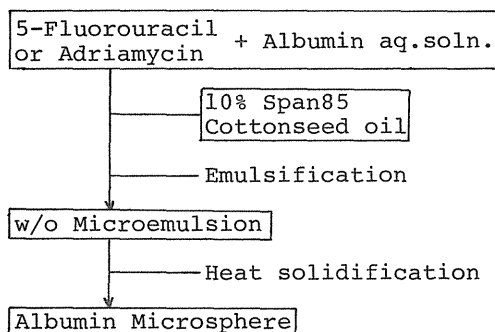


Chart 1 Schematic Diagram of Preparation of Albumin Microsphere Containing 5-Fluorouracil or Adriamycin

アルブミン小球体の物理化学的分析：小球体の走査型電子顕微鏡観察は、小球体を酢酸イソアミル中に懸濁させ、臨界点乾燥装置（日立，モデル HCP-2）で乾燥、次にイオンコーター（エイコー・エンジニアリング，モデル 1B-3）で蒸着し、走査型電子顕微鏡（日立，モデル S-430）で行った。

小球体の粒子径は 0.2% (V/V) polysorbate 80 を含む生理食塩水で懸濁し、更に超音波洗浄槽（Branson, モデル 220）で懸濁させてから、コールター・カウンター（Coulter Electronics, モデル Z_B）、もしくは接眼マイクロメーターをつけた光学顕微鏡（オリンパス，モデル BH）で測定した。

小球体中の薬物含有率測定は 5-FU または ADM 含有小球体を、それぞれ 2N-NaOH または プロテアーゼ で加水分解後、遠心し上清中の薬物量をそれぞれ UV 法²⁰⁾（日立，モデル 100-20）、けい光法²¹⁾（日立，モデル 650-10 S）で測定して含有率を計算した。

アルブミン小球体の毒性試験：5-FU を含有する小球体の毒性は、約 30 g の JCL-ICR 雄性マウスに一匹あたり 12.5, 25 もしくは 50 mg/0.25 ml の小球体を 1 回腹腔内に投与して、死亡率と中毒症状から推定した。

急性毒性（7 日）及び慢性毒性（30 日）の試験をそれぞれ一群あたり 20 匹のマウスを用いて行った。

アルブミン小球体からの薬物放出速度測定法：小球体懸濁液からの薬物放出は透析膜（36/32, Visking Co., Ltd.）を使った平衡透析法によって決定した。実験装置を Fig. 2 に示す。5-FU または ADM を含んだ 100 mg のアルブミン小球体は等張リン酸緩衝液（pH 7.4）に懸濁し、小球体に吸着している薬物を除去するために、100W, 10 分間超音波処理してから遠心した。上清を捨て、沈殿を等張リン酸緩衝液 3 ml に再懸濁して透析膜の内側に入れる（内液）。膜の外側には 47 ml の等張リン酸緩衝液を加える（外液）。内液はガラススターラーを用い 50 rpm で搅拌し、外液はアクロバットスターラー（エムエス機器）を使用し 200 ~ 300 rpm で搅拌した。また、内液、外液とも実験中は 37℃ に保った。

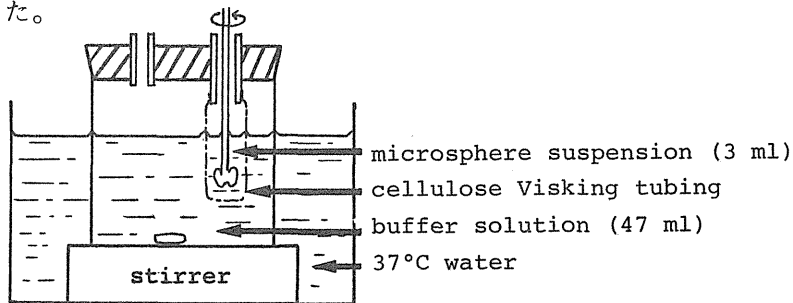


Fig. 2 Apparatus used to Study the Release of 5-Fluorouracil or Adriamycin from Microspheres

試料 1 ml を外液から経時的に採取し、容積を一定に保つため 1 ml の等張リン酸緩衝液を加えた。また透析膜への薬物の吸着は無視した。

外液中の薬物濃度の定量は、それぞれ 266²⁰⁾と 480 nm²²⁾の吸光光度法によった。

水解酵素存在下での放出実験：Fig. 2 に示した実験装置の内液にプロナーゼ[®] 1 mg か 15 mg、あるいはライソゾーム抽出画分 1 mg (蛋白濃度) を添加して前項と同様な方法で実験した。ライソゾーム画分は Ehrlich 腹水癌細胞 (後述) より、Lewis らの方法²³⁾ によって抽出した。また蛋白濃度の定量は Lowry らの方法²⁴⁾ によった。

Ehrlich 腹水癌によるアルブミン小球体の食作用の確認法：ICR 系雄性マウス (30 g) に Ehrlich 腹水癌細胞 2×10^7 個を腹腔内移植し、24 時間後に 5-FU 含有小球体 (5-FU として 1000 μ g) か生理食塩水 (0.3 ml) を腹腔内投与し、移植後 5 日に腹水を採取し、ギムザ染色を施した。

第 3 節 実 験 結 果

第 1 項 小球体の物理化学的性質

(1) 形 状

油中水型のエマルジョンを高温にすると、内相であるアルブミン溶液中の水が蒸発し、アルブミンが熱変性するため球形のマトリックスとなる。180 °C で固化した 5-FU 含有アルブミン小球体の走査型電顕写真を Fig. 3 に示す。

(2) 色

5-FU 含有小球体の色は調製時の温度によって多少の差があり、一般に 100, 150, 180 °C の固化温度ではそれぞれ黄色、黄褐色、茶色である。また ADM 含有小球体は、ADM 特有の赤みを帯びる。

(3) 粒度分布

Figs. 4 ~ 6 は 100, 150, 180 °C の固化温度で調製した 5-FU 含有小球体の水溶液媒中における粒度分布を示したものである。それぞれの小球体の粒子径範囲は 100 °C で調製した小球体が 0.6 ~ 1.5 μ m、150 °C のもので 0.4 ~ 1.2 μ m、そして 180 °C のものでは 0.4 ~ 1.0 μ m の範囲内にあった。また平均粒子径は 100, 150, 及び 180 °C でそれぞれ 0.96, 0.88 及び 0.66 μ m であって、100 °C で調製した小球体がいちばん大きかった。

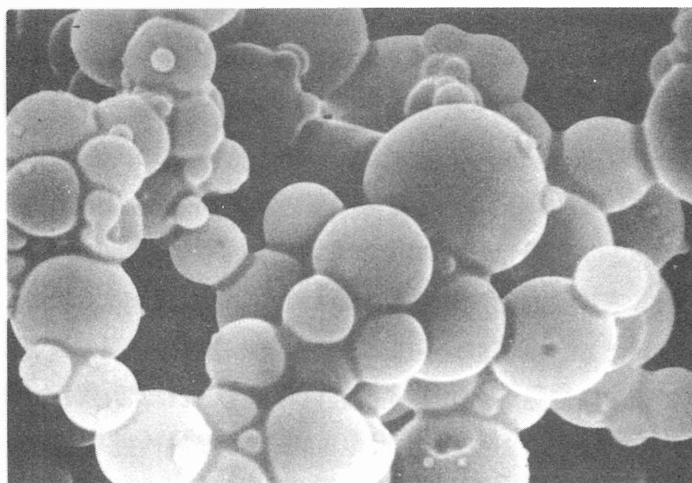


Fig. 3 Scanning Electron Micrographs of Albumin
Microspheres Containing 5-Fluorouracil
Prepared at 180°C

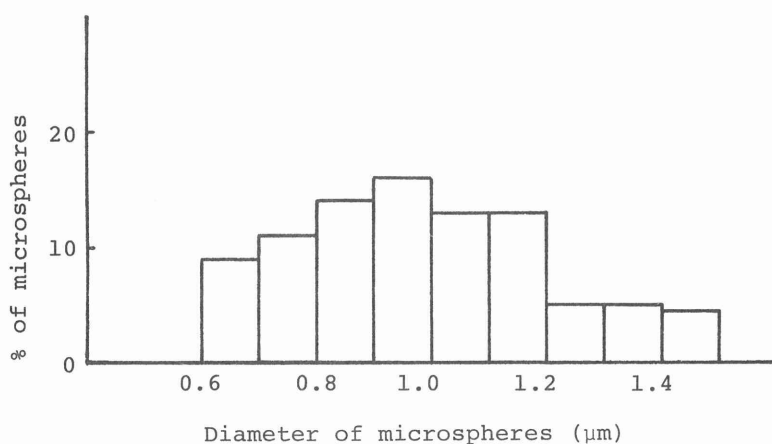


Fig. 4 Particle Size and Distribution of Albumin
Microsphere containing 5-Fluorouracil prepared
at 100°C

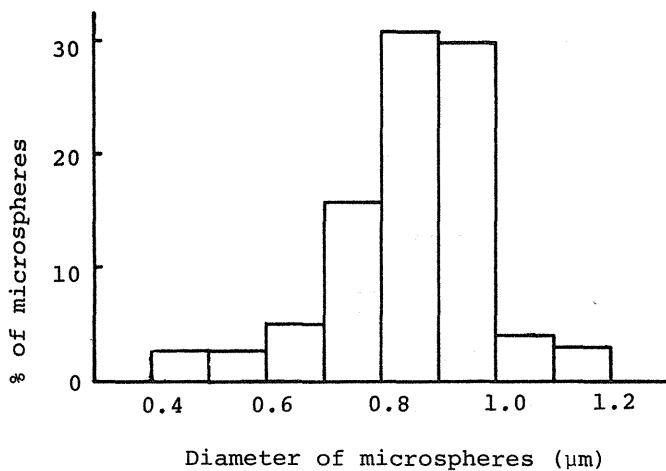


Fig. 5 Particle Size and Distribution of Albumin Microsphere containing 5-Fluorouracil prepared at 150°C

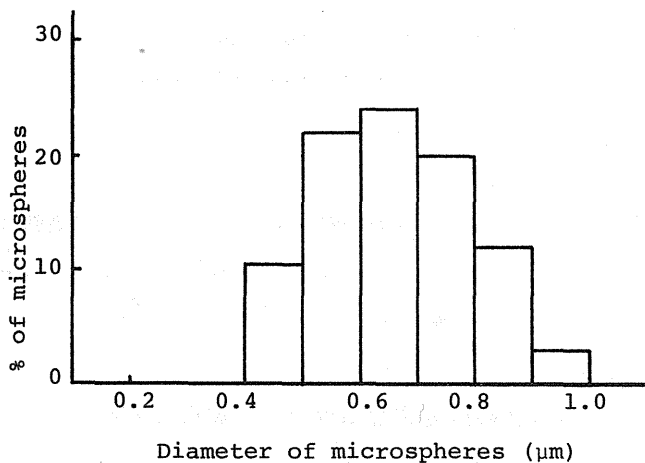


Fig. 6 Particle Size and Distribution of Albumin Microsphere containing 5-Fluorouracil prepared at 180°C

Fig. 7 は 170 - 180 °C で固化調製した ADM 小球体の粒度分布である。比較的大きな小球体 (≒ 3 μm) もみられ、平均は 1.44 μm であった。ほぼ同じ条件で小球体を調製しても、このように含有薬物の種類によって粒子径は変化した。

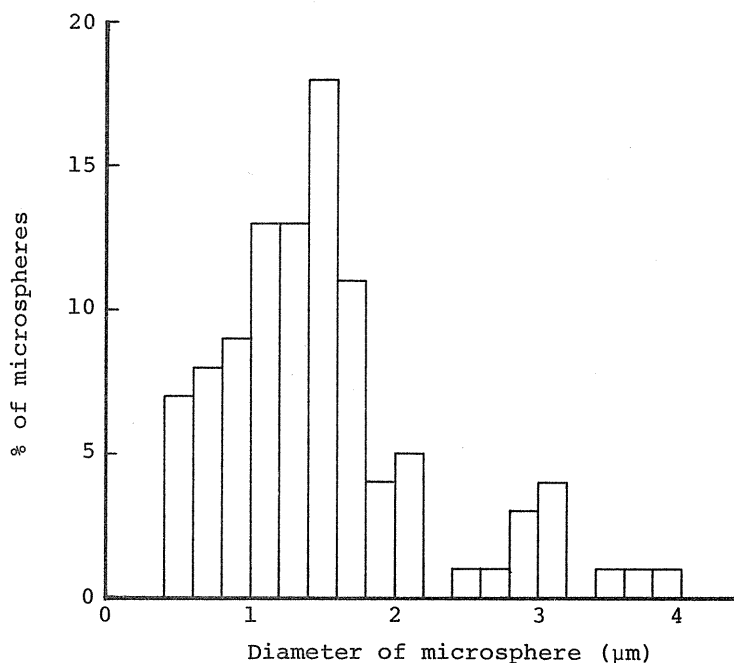


Fig. 7 Particle Size and Distribution of Albumin Microsphere containing Adriamycin

(4) 薬物含有率

実験に供した薬物含有小球体は、遊離薬物を除くため、小球体懸濁液に5分間超音波をかけ、遠心して上清を取り除いた。それゆえ最終的な小球体中の薬物含量は小球体1 *mg*あたり5-FUでは0.03–0.05 *mg*、ADMでは約0.15 *mg*であった。

(5) 安定性・分散性

5-FUとADMは温度に比較的安定な薬物で、分解点はそれぞれ282–283℃及び204–205℃である。それゆえ小球体調製に用いた温度(100–180℃)程度の熱には安定である。薬物粉末を180℃で10分間加熱した後、粉末の乾燥減量、吸収スペクトル(200–700 nm)並びにそれぞれ266または235 nmにおける吸光度についても検討したが、この実験からは加熱による5-FU及びADMの分解の証拠は見い出されなかった。

一方アルブミン小球体は調製時の固化温度を高くすると硬くなり密度も大きくなる。水溶液中に懸濁すると膨潤とか薬物の遊離が引き起こされるが、乾燥状態においては極めて安定であった。

小球体は生体内では徐々に分解していくと考えられるが、*in vitro* では苛性ソーダ溶液に懸濁し、沸騰水溶液中で約 1 時間加熱すれば溶ける。また蛋白分解酵素を使用しても可溶化することが出来る。

小球体の水溶液への分散は polysorbate 80 を使用することにより改善されたので、実験では 0.2 % (V/V) 添加した。

第 2 項 小球体の毒性

薬物担体となるものは、それ自体は生体にとって無毒であることが必要である。

Rhodes ら²⁵⁾ はマウスを用いてアルブミン小球体の毒性をチェックしたところ、その毒性がすでにスキヤニング剤として用いられているマクロアグリゲートアルブミンの 1 / 2.5、また水酸化鉄ゲルの 1 / 10 であることを見出した。彼らはまたヒトアルブミンに感受性のあるモルモットを用いてヒトアルブミン小球体を数回投与したが、抗原抗体反応がみられなかったことを報告している。加えて Bolles ら²⁶⁾ はアルブミン小球体のスキヤニング剤としての臨床応用における初期の二年間で合計 8,375 人の患者に肺造影を行ったが、うち 2 人にしか副作用がみられなかったこと、また 8,375 人のうち 1 人は小球体を 8 回投与したが、その患者に抗原抗体反応や過敏性反応がみられなかったことを報告している。

小球体の粒子径を小さくすると肺中の毛細管の閉塞やそれによるわずかな充血と出血²⁷⁾ はほとんど無視できると考えられるが、著者も粒子径 1 μm 以下の小球体を使ってマウスにおける急性及び慢性毒性の確認を行った。それぞれの研究には一群 20 匹としたが、一匹あたり 50 mg (約 1.7 g / kg) もの小球体を腹腔内投与しても死亡するマウスは見い出されなかった。また肉眼的所見ではあるが、局所的な潰瘍も脱毛も観察されなかった。加えて第 2 章以降における静脈内投与実験においても死亡するマウスやラットはみられなかった。

第 3 項 小球体からの薬物放出

5-FU もしくは ADM を含有した小球体からの *in vitro* における薬物放出挙動を Visking チューブを用いた透析法で試験した。

Fig. 8 は 100, 150 及び 180 $^{\circ}\text{C}$ の各固化温度で調製した 5-FU 含有小球体からの薬物放出を経時的に測定した結果である。小球体に組み込まれた 5-FU の放出パターンは

調製温度によって多少の差はあるが、まず初期に多量の薬物が放出され、以後非常にゆっくりとした速度で放出されるという2つの放出過程のあることが確認された。各々の小球体からの放出量は100℃の場合、一週間で32%程度、150℃では12%程度、180℃で8%程度であり、一週間後でも一定の薬物を放出しているのが認められた。また調製温度が高くなるに従って放出量が減少するという結果が観察された。

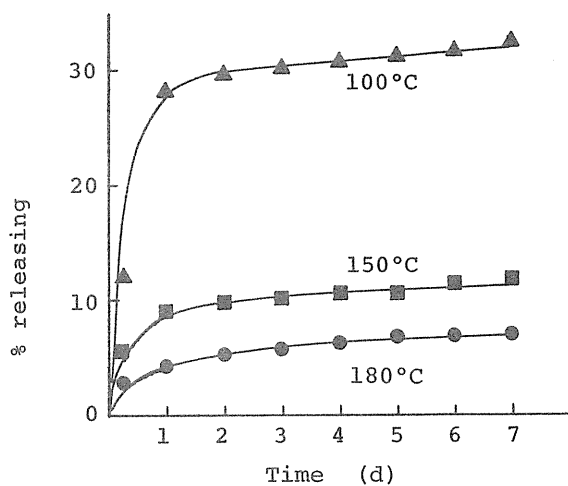


Fig. 8 Release of 5-Fluorouracil from Albumin Microspheres
Each point represents the average of three experiments.

なお、以下に示した 5-FU 含有小球体は、特に断わらない場合 150℃で固化した小球体をさす。

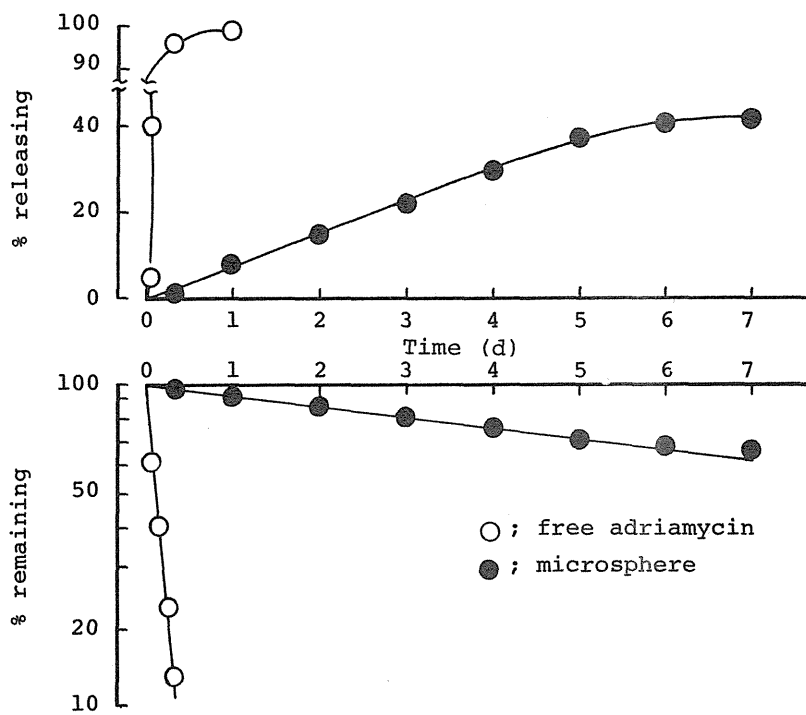


Fig. 9 Release of Adriamycin from Albumin Microspheres
Each point represents the average of three experiments.

Fig. 9はADMの放出を示している。図から明らかな様に、Visking 透析チューブからの遊離ADMの放出は非常に速いのに対し、小球体から透析チューブを経由したADMの放出はかなり遅い。遊離薬物の Visking チューブ透過半減期 ($T_{50\%}$)は約 0.5 時間であった。一方残存率の片対数プロットから、小球体からのADMの放出は実験開始後 4 日まではほぼ一次速度に従っており、その半減期は約 7.3 日であった。また 7 日目までに放出した累積 ADM 量は 42.5 %であった。この様にADMを小球体に含有させることによってADMの放出を著しくおくらせることが出来る。またADMの放出は、5-FU 含有小球体の様に “Burst effect”²⁸⁾と呼ばれる初期の多量放出もみられなかった。

第 4 項 水解酵素による薬物放出の促進

アルブミン小球体は標的組織（細胞）内に取り込まれた後、細胞内のライソゾーム酵素により消化分解をうけることが考えられる。²⁹⁾

そこで著者はこれらの活性を *in vitro* において検討するため、ライソゾーム抽出分画及びプロテアーゼ（蛋白分解酵素）の存在下での 5-FU 小球体からの薬物放出量を測定した。その測定結果を Fig. 10 に示す。

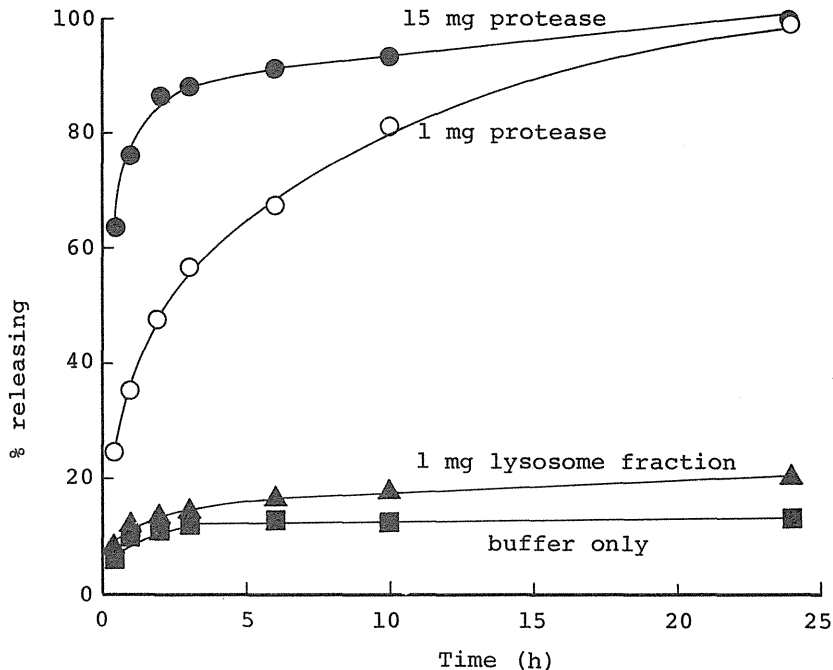


Fig. 10 Effect of Hydrolytic Enzymes on the Release of 5-Fluorouracil from Albumin Microspheres
Each point represents the average of three experiments.

プロテアーゼとライソゾーム分画処理の放出量の違いは、酵素の種類とその活性が異なるので、一概に比較することはできないが、酵素が存在していない小球体単独の場合と比較して、プロテアーゼやライソゾーム分画処理で増加するのが観察された。このことから、小球体による薬物放出も単なる物理的放出と、細胞内に取り込まれた後ライソゾーム酵素によって熱変性アルブミンが加水分解され薬物を溶出する 2 種類の過程を考えることができる。

第 5 項 小球体の食作用による取り込み

ある種の癌細胞は活発な細胞内取り込み作用や有糸分裂活性を有していることはすでに知られていることである。¹⁰⁾ つまり、これらの作用は正常細胞より癌細胞に特異的であるか、活発な性質であり、ことに細胞内取り込み作用によって、癌細胞が高分子や小

球体などを取り込むことは注目すべきである。^{30,31)}

これらの事実から、癌細胞に特異的に取り込まれるような担体に薬物を付加含有させることが出来れば、その薬物含有担体の投与によって、細胞内のライソゾームに選択的に作用し、癌細胞はその生命力を維持することが不可能となると推測される。⁹⁾

そこで Ehrlich 腹水癌を移植したマウスにアルブミン小球体を腹腔内投与し、*in vivo* における小球体の取り込みについて検討した。小球体投与後 5 日に、腹水を採取して光学顕微鏡で観察したところ、細胞内に未処理のものでは認められない小球体と思われる球形の点がみられた。この観察結果を Fig. 11 に示す。

しかし、これらの現象は今だ不明の点が多々あり、形態学的並びに生化学的な面からの更なる検討が必要と思われる。

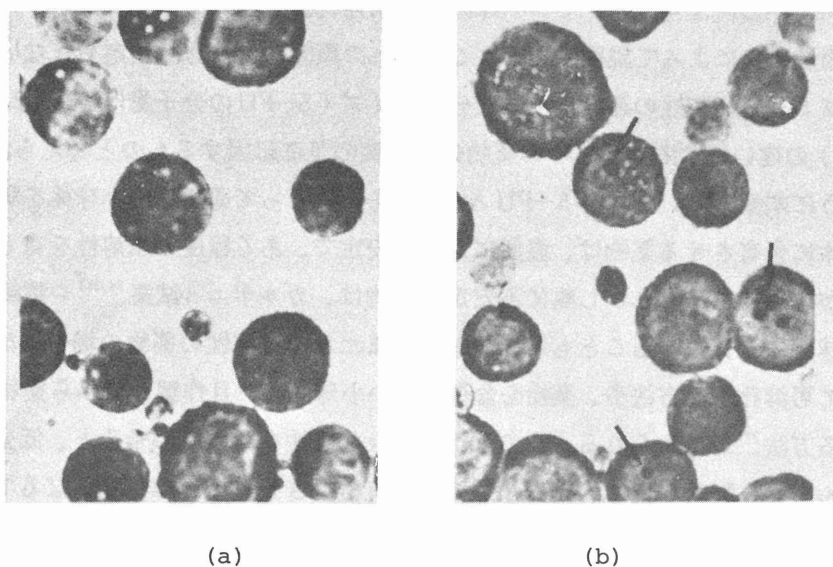


Fig. 11 Micrographs of Ehrlich Ascites Carcinoma
(a) control, (b) after treatment with albumin microspheres. Arrows indicate microspheres phagocytized by tumor cells. Giemsa stain, magnification x 600.

第4節 小括と考察

アルブミン小球体の粒子径は調製第1段階で作成したエマルションの粒子径に依存し、更に乳化と攪拌の強度が影響する。³²⁾ しかし、小球体を水溶液中に懸濁したときに生じる Swelling (膨潤) は小球体の粒子径を増加させることで知られている。³³⁾ それ故、懸濁した時、粒子径は時間とともに一定の大きさまで膨潤する。また Swelling の程度は小球体の調製温度が増加するにつれて減少することも知られている。Figs. 4~6 の 5-FU 含有小球体の粒子径は polysorbate 80 を含んだ生理食塩水に懸濁1時間後に測定したもののだが、調製温度によって粒子径に差が生じるのはこれらの原因によるものと思われる。また ADM 含有小球体は、ほぼ同じ条件で調製しても 5-FU 小球体より大きかった (Fig. 7)。これは定性的な観察であるが、ADM-アルブミン混液の粘度が 5-FU の場合よりはるかに高く、綿実油への乳化の際に大きくても安定なエマルションを形成したためだと考えられる。

5-FU 及び ADM 含有アルブミン小球体の薬物含有量の違いについては、小球体からもれる薬物量の差によって説明できる。このもれの原因ははっきり断定できないが、薬物とアルブミンの親和性の違いや、また分子サイズ (5-FU の分子量は 130.08, ADM は 579.98) の違いによる小球体中の薬物の易動度の差に起因するものと考えられる。

このように本章においては、5-FU と ADM を例にとって薬物含有小球体を調製したが、小球体に含有させる薬物は、温度に対して安定で、ある程度の水溶性を有していた方が調製が容易である。しかし熱に不安定な薬物は、カルボニル試薬^{34,35)} や電解質³⁶⁾ を用いて小球体に含有させることも可能であり、また水に難溶性の薬物の場合は溶解補助剤を使って可溶化する方法や、薬物を含有しない小球体を一旦作製してから薬物を化学結合させる方法³⁷⁾ が考えられる。このような様々な方法を考えあわせると、低分子薬物はもちろんのこと酵素や抗体³⁸⁾ でも小球体に含有結合させることが可能になるであろう。

また、5-FU や ADM を含有したアルブミン小球体の *in vitro* における放出挙動 (Figs. 8, 9) から、この薬物担体は何日間にもまたがる徐放性を示し、薬効の持続化が期待されることがわかった。

更に生体内に投与された小球体は食作用によって細胞内に取り込まれるとも考えられ、次に細胞内に入った小球体はライソゾーム中に存在する蛋白分解酵素の作用を受けて、小分子のペプチドあるいはアミノ酸になると予想される。

このようにアルブミン小球体は生体内で分解しうる (biodegradable) 薬物担体であるばかりか、抗体産生能が極めて低い蛋白小球体だと考えられる。またこの小球体は過

去スキャンニング剤として臨床でも応用されてきたために、その安全性のチェックはほぼ十分であるといえる。

以上、本章で述べたことから、アルブミン小球体は安定・安全で、含有薬物の徐放性を有する薬物担体であることがわかった。

第 2 章

アルブミン小球体の生体内分布¹⁸⁾

第 1 節 緒 言

第 1 章で述べたように、アルブミン小球体はその調製法により粒子径を調節することができる。この小球体を臓器のスキャン剤として利用して来た放射線医学者たちも、主にその粒子径を変えることにより、一方では肺のスキャン剤として、またもう一方では肝臓や脾臓のスキャン剤として応用してきた。

本章ではアルブミン小球体の粒子径や固化温度が、含有薬物や担体の生体内分布にどの程度影響するかを、トリチウム標識した 5-FU を含有した小球体や ^{125}I - ヒト血清アルブミンを含有させた小球体を用い、一定時間毎の体内分布を臓器内のトリチウム及び ^{125}I の放射活性を指標にして考察した。また癌細胞のあるものは血管新生が盛んになり、食作用も活発になると報告されているので、³⁹⁾ 本章では更に Ehrlich 固型癌マウスと、食作用を飽和したマウスを用いて行った実験結果も併記した。

第 2 節 実験材料と方法

実験材料： ^{125}I - ヒト血清アルブミン (^{125}I - HSA) (科研化学) と $6\text{-}^3\text{H}\text{-}5\text{-FU}$ (Amersham) の比活性はそれぞれ $2.5\ \mu\text{Ci}/\text{mg}$, $7.69\ \text{mCi}/\text{mg}$ であった。放射標識アルブミン小球体作成には、これらトレーサーをそれぞれ BSA または 5-FU に適量加えて行った。なおアルブミン小球体の作成法は前章で述べた方法と同様であるが、平均径 $2\ \mu\text{m}$ 以上の大きい小球体に関しては攪拌強度を下げて作成した。パルミチン酸メチルは和光純薬の特級品を用いた。また 5-FU の定量に用いた臭化テトラペンチルアンモニウムは Eastman Kodak 社から、テトラペンチルアンモニウム対イオンは De

Leenheer⁴⁰⁾の方法によった。

実験動物：実験動物は主に JCL-ICR 雄性マウス、30 日前後を用い、比較のため行ったラットの実験には Wistar 系雄性ラット、体重 200 日前後を用いた。

食作用飽和マウス、及び Ehrlich 固型癌マウスの作成：マウスの phagocytic activity を飽和させる物質として、パルミチン酸メチルと薬物を含有しないアルブミン小球体を使用した。パルミチン酸メチルを使った食作用飽和は Luzio⁴¹⁾の方法に準じた。まず分散剤として polysorbate 20 を 0.1 % (V/V) 含有する 5 % ブドウ糖溶液 1 ml にパルミチン酸メチル 100 mg を加え、50℃ 100 W で 100 分間超音波処理し、これを 1.2 mg/日 の用量でマウスの尾静脈から 3 日連続投与する。3 日目の投与から 24 時間後に実験に供した。アルブミン小球体による方法は 180℃ で固化した粒子径 1 μm 以下の小球体をマウス一匹あたり 5 mg/0.5 ml 尾静脈内投与した。実験はその後 5 分後に開始した。

Ehrlich 固型癌マウスの作成は、本教室でマウスに 10 日に 1 回腹水型として継代維持している Ehrlich 腹水癌細胞を用いた。Ehrlich 癌の植え継ぎは、 2×10^7 個の腫瘍細胞を 10 日毎に移植し継代した。固型癌は腹水癌 2×10^7 個を滅菌生理食塩水で 0.25 ml とし、マウスの右腋窩皮下に移植した。約 10 日後体内分布の実験に供した。

凝集アルブミンの調製：³H-5-FU を含有した BSA 凝集体は Thomas⁴²⁾ に準じて用時調製した。まず標識 5-FU 溶液 1 ml 中に 25 mg の BSA を溶かし、0.1 N-HCl で pH を 5.7 ± 0.2 にあわせる。これを攪拌下 90℃ に加熱すると凝集アルブミンが生成する。その後凝集アルブミンの洗浄と遊離薬物の除去のため、少量の水を加え、10 分、100 W で超音波処理する。遠心後生理食塩水 10 ml を沈殿に加え、超音波洗浄槽で分散させ実験に使用した。

小球体の投与方法：アルブミン小球体は分散をよくするため polysorbate 80 を 0.2 % (V/V) 含んだ生理食塩水に入れ、5 分間超音波洗浄槽で処理後、3000 rpm で遠心して小球体に弱く吸着並びに結合している薬物を取り除いた後、再度沈殿に 0.2 % (V/V) polysorbate 80 生理食塩水を加え、超音波処理をしてよく分散させてからマウスまたはラットの尾静脈より一匹あたり 5 mg/0.5 ml 投与した。

未変化 5-FU 定量法：生体液中の 5-FU は De Leenheer⁴⁰⁾に従って新しく開発した分光光度法によって定量した。操作法の概略を Chart 2, 検量線を Fig. 12 に示す。

なお、この定量法では pH 10 でモノアニオンとして存在し、テトラペンチルアンモニウム対イオンとイオン結合する性質を有する化合物が抽出され、紫外領域 (269 nm) での吸光度が測定される。従って 5-FU と 5-FU の基本骨格を有する化合物のみが有

機溶媒に抽出測定されるので、本定量法で測定した値は、ほぼ 5-FU の濃度を示していると思われる。

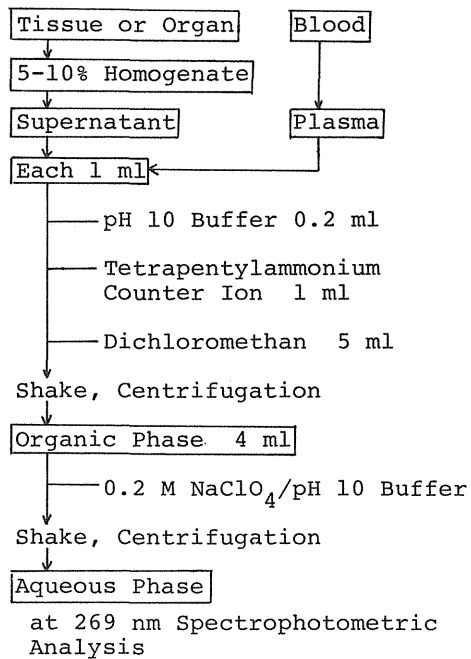


Chart 2 Determination of 5-
Fluorouracil in Bio-
logical Fluids

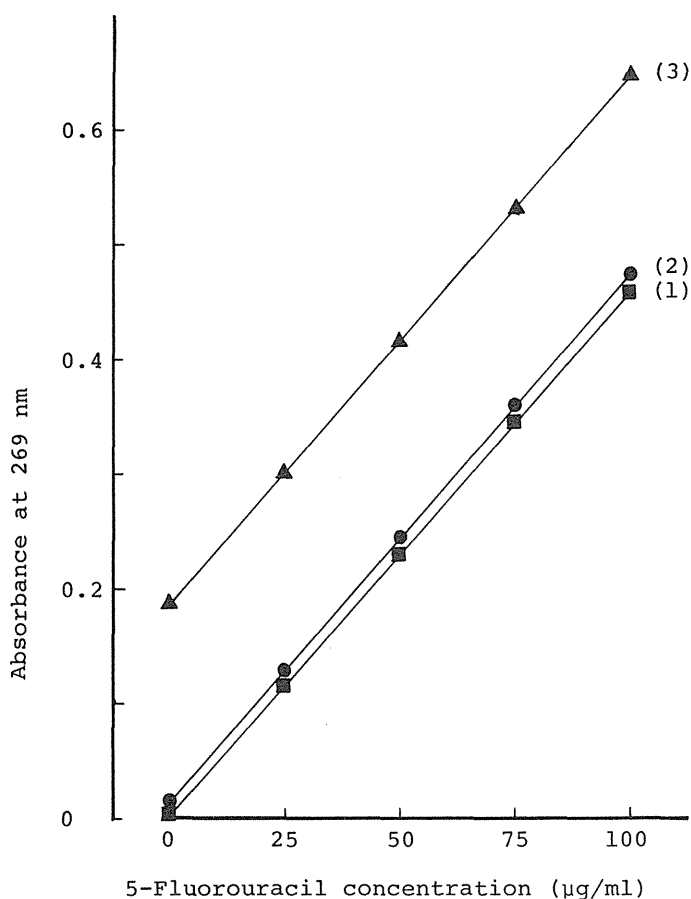


Fig. 12 Calibration Curves for 5-Fluorouracil in Aqueous Solution (1), Plasma (2), and Supernatant of Liver Homogenate (3)

臓器中及び血中放射能量の測定：動物を断首して頸部より採血、開腹して心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓などの臓器を取り出し、湿重量測定後、トリチウム活性の測定は、よく乾燥後自動燃焼装置（アロカ、モデルASC-111）で燃焼し、液体シンチレーションカウンター（アロカ、モデルLSC-651）で測定した。

なおクエンチングの補正は外部標準比法によった。

Table II にシンチレータ組成を示した。

Table II Composition of Liquid Scintillator

dioxane	750 ml
toluene	150
methanol	100
PPO	4 g
POPOP	0.4
naphthalene	100

¹²⁵I ー放射活性は各組織や臓器及び血液をそのまま専用バイアルに入れ、オートガン

マカウンター（Packard, タイプ 5110）で測定した。なお測定日が投与日より 3 日以上離れた場合は活性の減衰を補正した。

第 3 節 実験結果

第 1 項 小球体の粒子径と生体内分布

アルブミン小球体をマウスに静脈内投与すると、小球体はその粒子径に依存して各臓器に分布する。小球体調製時のアルブミン溶液に ^{125}I - 標識ヒト血清アルブミンを加えることによって小球体は ^{125}I で放射標識することができる。こうして得た ^{125}I - 小球体を 37°C で 24 時間インキュベートしても、遊離の放射活性がみられないことから、小球体の ^{125}I - 放射活性保持能力は非常に優れており、そのため ^{125}I - 小球体投与後の小球体の分布は、 ^{125}I - 放射活性を測定することによって確めることができる。

Fig. 13 はマウスに 180°C で固化した 2 種類の ^{125}I - 小球体（Type S と Type L；Table III）を一匹あたり $5\text{ mg}/0.5\text{ ml}$ 尾静脈内投与した後 60 分における ^{125}I - 放射活性の臓器分布を示している。粒子径の小さい小球体（Type S）を投与した場合は、そのほとんど（78.0% of dose）が肝臓に取り込まれ、次に肺への分布（11.2%）が高く、その他の組織（心臓、脾臓及び腎臓）や血液中には僅かしかみられなかった。一方大きい小球体（Type L）の場合は逆に主に肺（78.8% of dose）に分布し、肝臓は 9.6% であった。

Table III Particle Size of
 ^{125}I -Albumin Microsphere

	diameter (μm)	
	mean	range
Type S	0.7	0.4 - 1.0
Type L	11.0	4 - 20

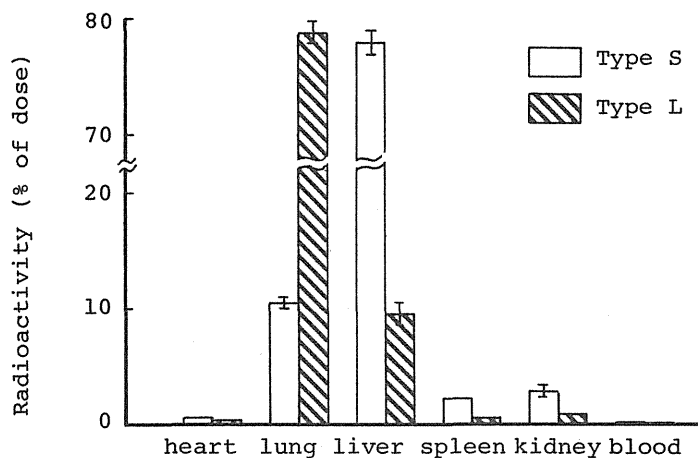


Fig. 13 Effect of Particle Size of Albumin Microspheres on the Tissue Distribution of Radioactivity at 60 min after Intravenous Injection in Mice

Each column represents the mean \pm S.E. of 5 mice.

次にラットを用いて体内分布を調べた。Fig. 14はラットに Type S 小球体をマウスと同量投与した場合の体内分布を示している。肝臓への分布は 85.3 % of dose となりマウスより高い。一方肺への分布は 7.0 % でマウスの値より低かった。

これら ^{125}I 小球体をマウスとラットに投与した実験から、静脈内投与した小球体は主に肝臓と肺に分布すること、また $1\text{ }\mu\text{m}$ 以下の粒子径をもつ小さい小球体は肝臓に、大きい小球体は肺の方に選択的に分布すること、更に動物の大きさによってこの 2 つの臓器への分布の程度が変化することがわかった。小球体の臓器への取り込み機構はこれだけでは結論づけられないが、大きい小球体は肺の毛細血管や前毛細血管に分布し、²⁷⁾ $1\text{ }\mu\text{m}$ 以下の小球体は食作用が活発である肝臓の細網内皮系に取り込まれたものと推測される。

第 2 項 5-fluorouracil 定量法の検討⁴³⁾

次に含有薬物である 5-FU の体内分布を調べるため、その定量法を検討した。5-FU はその構造（緒論に構造式記載）から明らかな様に水溶性で官能基が少ないため、有機溶媒に抽出することが難しく、血液中や組織中のごく微量の薬物レベルを抽出定量することは極めて難しい。過去分光法、⁴⁴⁾ TLC⁴⁵⁾ 及び GLC 法⁴⁶⁾ 等が開発されたが、どれも実用化には至っていない。

De Leenheer ら⁴⁰⁾ は 5-FU が pH 10 でモノアニオンとなり、テトラアルキルアンモニウム塩のようなモノカチオンとイオン対を作ることを報告している。このイオン対は脂溶性でクロロホルムのような有機溶媒に抽出され、次に過塩素酸イオンを含む水溶液と再振とうすると、対イオン中のテトラアルキルアンモニウムカチオンは過塩素酸アニオンと対イオンを作り、5-FU モノアニオンを単離する。

著者は彼らの 5-FU イオン対抽出法を応用して、生体液中 5-FU の UV 定量法を開発した。Fig. 15 はこの方法によって定量したマウス血液中及び臓器中の 5-FU 濃度を示している。投与量は 1.25 g/kg 、投与部位は尾静脈とした。

図から明らかな様に、血中 5-FU の消失は速く、投与後 1 時間後の血中濃度は 5 分後の値の約 $1/10$ まで減少した。一方臓器中濃度は腎臓が一番高く、次に肺、肝臓の順であった。それぞれ臓器中の最高値は投与後 10 分にみられ、5-FU の分布が速いことがわかる。

この方法は先に示した 3 つの化学定量法に比べ簡便、敏速で、かつ比較的感度も良い方法であるが、ラジオアイソトープを用いた方法⁴⁷⁾ に比べると感度も低く、定量時間も

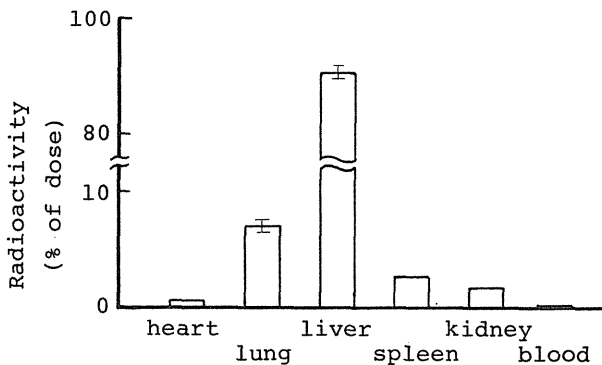


Fig. 14 Tissue Distribution of Radioactivity
at 60 min after Intravenous Injection
of Albumin Microspheres in Rats
Each column represents the mean \pm S.E. of 5
rats

長い。Fig. 16は ^3H ー標識した 5-FUを用いて、その放射活性から体内分布を測定したものである。図から明らかなように、ほとんどの放射活性は注射後すぐに循環系から消失し、そのいくらかが肝臓と腎臓に存在する。しかし肝臓中の放射活性は 42.7 % of dose (10分) から 1.0 % (240分) まで減少し、その速度も速いことが示された。これらトリチウム値は未変化の 5-FU と代謝物中のトリチウムレベルの和であると考えられ、ほぼ未変化物のみの挙動を示していると考えられる Fig. 12 と比べると、これらトリチウムレベルのほとんどは代謝物に起因することは明らかである。

5-FU の代謝は速く複雑で²⁰⁾ ^3H や ^{14}C で標識した 5-FU を使って体内レベルを査定する際、その放射活性は当然のことながら未変化薬物とその代謝物中の放射活性の和として示される。遊離 5-FU の分布は小球体中に含有された 5-FU や小球体自体の分布と比較することによって明確になると考えられるので、実験に用いる定量法は小球体に組み込まれた 5-FU も簡便に測定できることが必要である。先に示した UV 法は、小球体に組み込まれた 5-FU も合わせて定量する場合は、強力な小球体溶解剤での処理が必要になる。

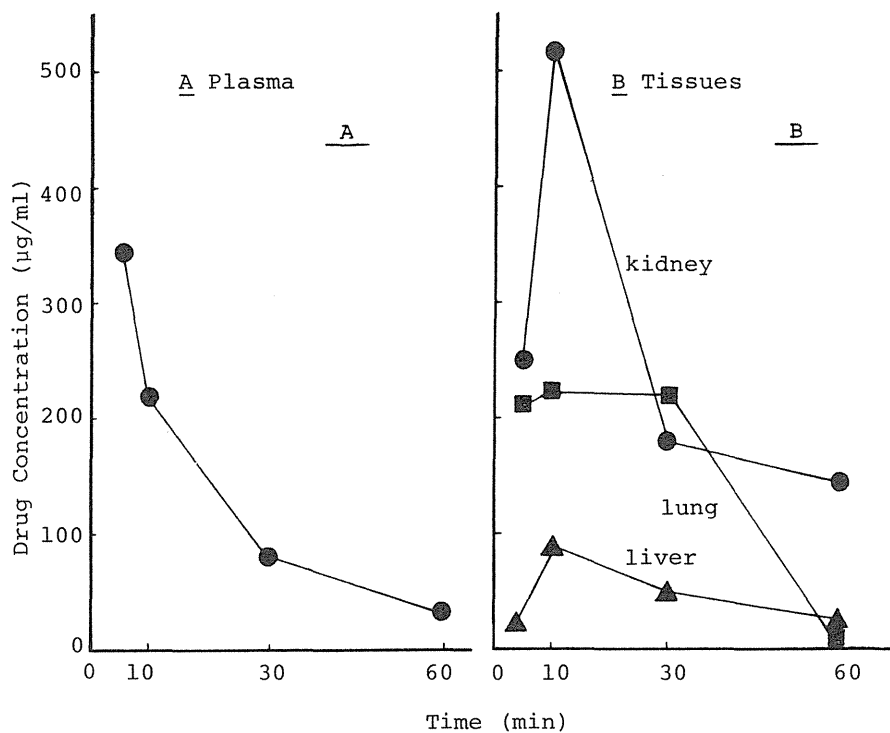


Fig. 15 Plasma and Tissues Concentration of 5-Fluorouracil in Mice

Each point was determined after a mouse was sacrificed at 5, 10, 30, and 60 min. Blanks of plasma and tissues were obtained from an untreated mouse.

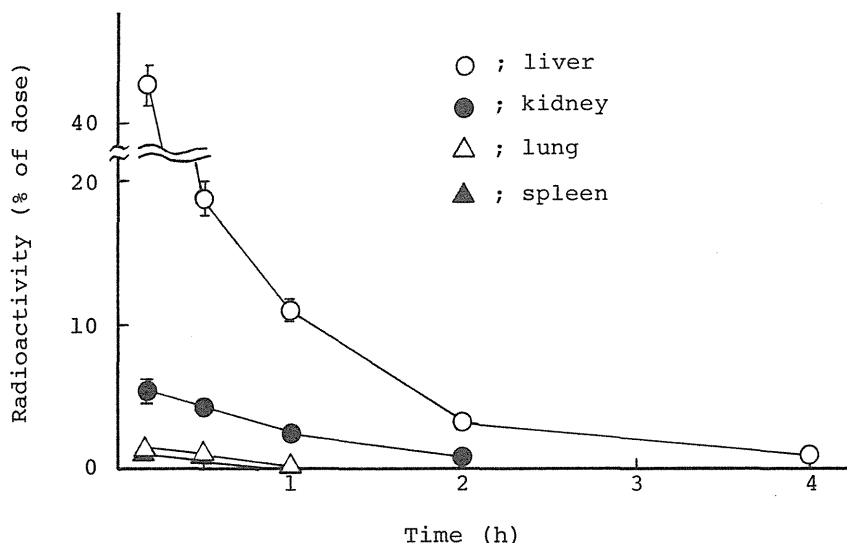


Fig. 16 Time Course of Radioactivity in Some Tissues after Intravenous Injection of ^3H -5-Fluorouracil in Mice
Each point represents the mean \pm S.E. of 3-7 measurements.

このような理由から、小球体、遊離 5-FU 並びに小球体中 5-FU の体内レベルの比較には、 ^3H -標識した 5-FU を用いた。以後述べる 5-FU と 5-FU 含有小球体投与後の薬物の体内分布には、 ^3H -放射活性を指標に述べる。

第 3 項 小球体に含有された薬物の生体内分布⁴⁸⁾

アルブミン小球体をマウスに静脈内投与すると、担体である小球体の体内分布は小球体の粒子径に左右された(第 1 項)。そこで、 ^3H -5-FU を含有した小球体を調製し、含有薬物の分布に関する小球体粒子径の影響を更に詳しく調べた。使用した小球体は 3 種類で、固化温度は全て 180 $^{\circ}\text{C}$ である。それぞれ小さい小球体から Type S, M 及び L とし、平均粒子径と粒子範囲を Table IV に示した。

Table IV Particle Size of Albumin Microsphere Containing ^3H -5-Fluorouracil

	diameter (μm)	
	mean	range
Type S	0.7	0.4 - 1.0
Type M	2.3	1 - 5
Type L	11.9	4 - 20

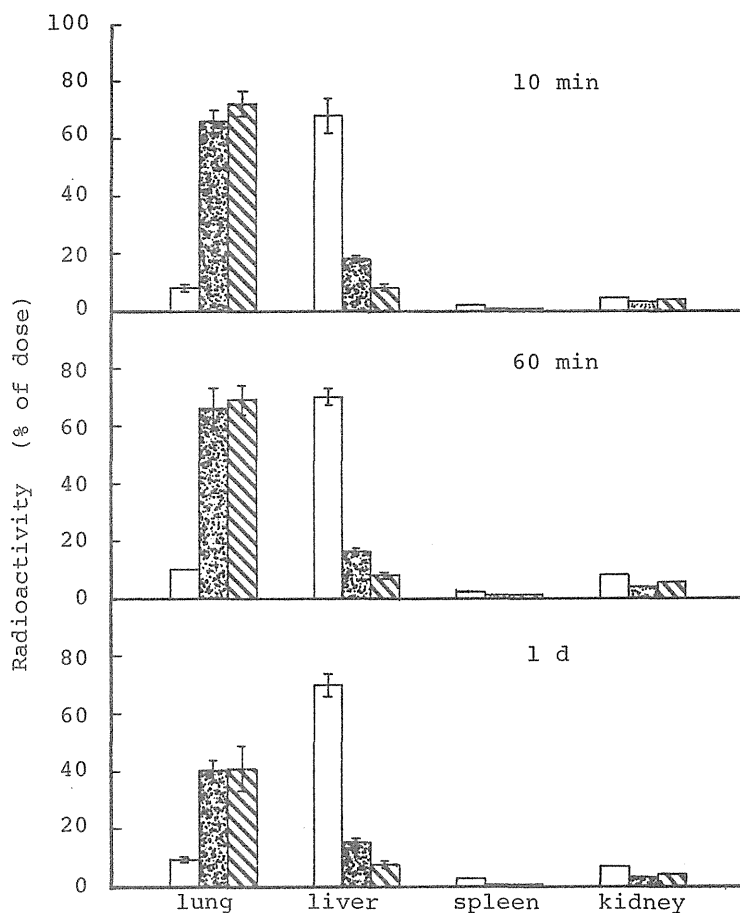


Fig. 17 Effect of Particle Size of Albumin Microspheres on the Tissue Distribution of Radioactivity after Intravenous Injection in Mice

□ Type S, ▨ Type M, ▩ Type L

Each column represents the mean \pm S.E. of 5 mice.

Fig. 17は ^3H -5-FU 含有小球体をマウスに一匹あたり 5 mg 投与後、10分、1時間及び1日における各臓器中のトリチウム量を示している。予想された通り、粒子径の小さい小球体は肝臓に集まり、大きい小球体は肺に存在していることが確かめられた。また肝臓に取り込まれた小球体のクリアランスは非常に遅く、投与後24時間でも取り込まれた放射エネルギーはほとんど変化しないことがわかった。肺中のクリアランスは肝臓に比べると

比較的速いと考えられる。Type M, L の大きい小球体では、どちらも投与後24時間では、1時間の値に比べ、約43%減少している。一方小さい小球体 (Type S) の肺での消失は遅く、これらS小球体とM及びL小球体の肺における取り込み様式が違うことが予想される。

更にマウスにおける投与後1時間の小球体の分布挙動 (Fig.13) と含有薬物の分布挙動 (Fig.17) を比較した。それぞれの Type S と L の小球体の粒子径はほとんど同じ (Table III と IV 参考) であるので、どちらの小球体を投与しても小球体自体の臓器分布には変化がないと考えられる。Type S, L 共 ^{125}I とトリチウムの放射活性の分布にはほとんど変化がないが、Type S 小球体では肝臓への取り込みが ^{125}I では約78% of dose であるのに対し、トリチウムでは72%と僅かではあるが減少している。同じ現象は肺にもみられる。一方腎臓中の放射活性は ^{125}I レベルよりトリチウムの方が高くなっている。Type L 小球体でも肺と肝臓中の放射活性は ^3H より高くなっているのに対し、腎臓では逆になっている。 ^{125}I レベルが小球体自体のレベルを、またトリチウムレベルは小球体内の ^3H -5-FU と小球体から遊離したトリチウムレベルの和であると考えあわせると、主に肺や肝臓に取り込まれた小球体はその部位で薬物遊離を引き起こし、遊離された 5-FU はそのまま、もしくは代謝されて腎臓に分布してゆくものと考えられる。

含有薬物の挙動については、次項で小球体の固化温度の影響とあわせて更に報告する。

第4項 小球体の固化温度と生体内分布

アルブミン小球体の静脈投与後の生体内分布は、その粒子径の影響を受ける。小球体の調製時にその粒子径を決定する要因は、まず乳化の際の攪拌強度があげられる。しかし微少エマルジョンを固化する際の温度によっても小球体の粒子径は変化してくる。(第1章参照)

Fig.18は攪拌強度を同じとし、固化温度を100, 150及び180℃とした ^3H -5-FU含有小球体をマウスに静脈内投与後、それぞれ10, 60及び240分後の各臓器中の放射活性の分布を示したものである。小球体の粒度分布は第1章Figs. 4, 5及び6と同様である。なお比較のために遊離 ^3H -5-FUとマクロアグリゲートアルブミン(凝集アルブミン)の体内分布を添えた。マクロアグリゲートアルブミンは ^3H -5-FUを溶かしたアルブミン水溶液を沸とう水浴上で攪拌加熱して作ったもので、これも肝臓等のスキニング剤として応用されている。⁴²⁾

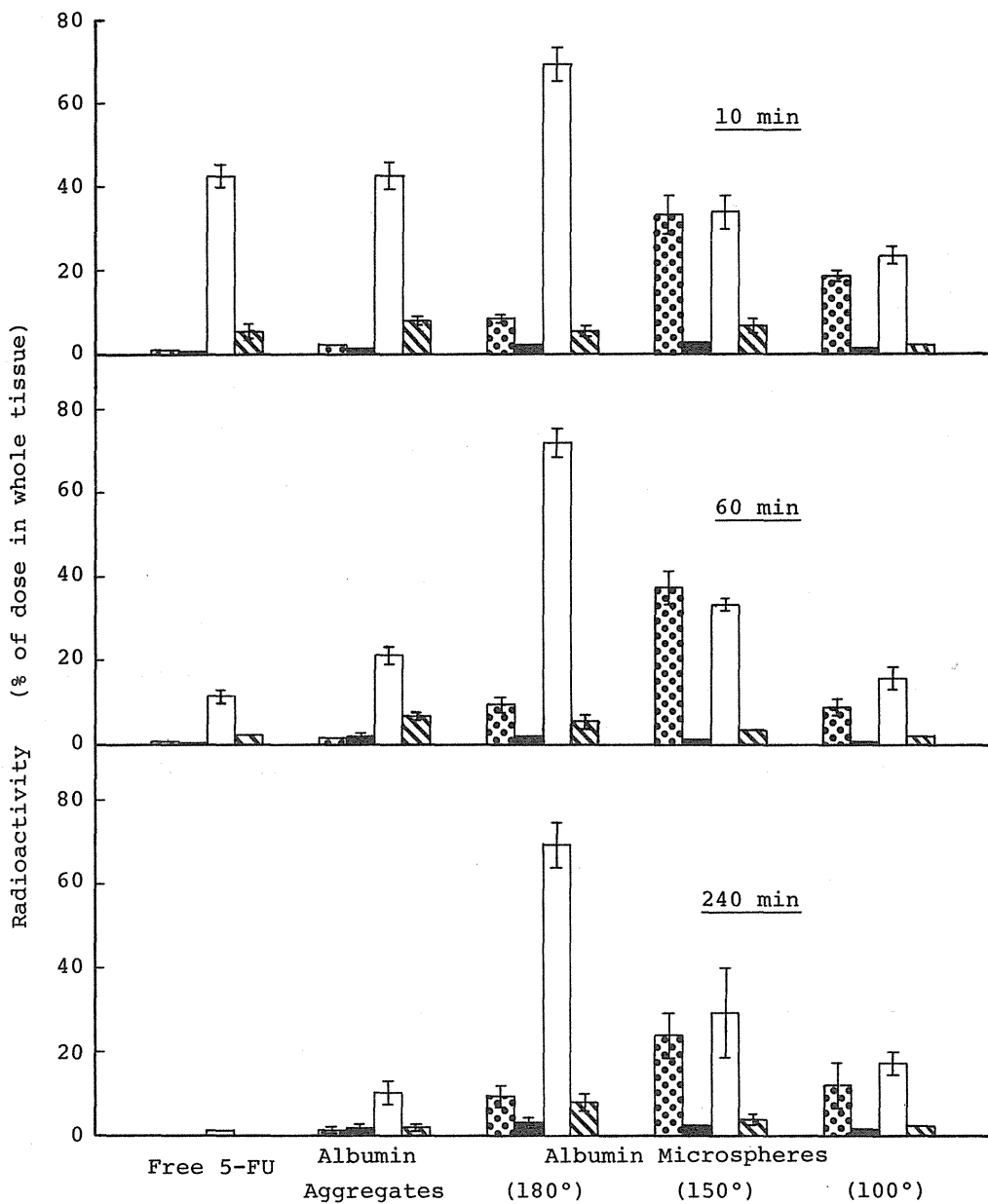






Fig. 18 Tissue Distribution of Radioactivity after Intravenous Injection of Free 5-Fluorouracil, Albumin Macroaggregates, or Three Types of Albumin Microspheres

 : lung,
  : spleen,
  : liver,
  : kidney

Each column represents the mean \pm S.E. of 3-7 mice.

前述した様に遊離型 5-FU の場合は、注射後すぐにほとんどの放射活性が循環系からなくなり、そのいくらかは肝臓と腎臓に存在する。しかし肝臓中の放射活性は 42.7% (10分) から 1.0% (240分) まで減少した。一方薬物を含有したマクロアグリゲートアルブミンは10分で投与量の約40%が肝臓にあり、240分後でも10%が肝臓にみい出された。180℃で固化したアルブミン小球体の場合は、投与量の約70%もの量が肝臓に局在した。この値は薬物を含有したマクロアグリゲートアルブミンや遊離薬物の静注後の値と比べても非常に高い値であることがわかる。180℃で固化した小球体は、その高い食作用のために細網内皮系に運ばれたものと思われる。アルブミン小球体の調製時の温度は、静脈内投与後の生体内分布に思わぬ影響を及ぼした。150や100℃で調製した小球体は肝臓だけでなく肺にも多量存在していた (Fig.18)。Zolle ら²³⁾ は小球体を水溶液中に懸濁させると膨潤 (Swelling) がおこること。またその膨潤の程度は調製温度に依存することを指摘している。小球体のこの膨潤は肝臓への分布だけでなく、肝臓への蓄積にも影響すると思われる。

Fig. 19と20は同様に 100, 150 及び 180℃で固化した小球体に関し、マウスに静注後10分から3日までの肝臓中と肺中の放射活性の消失を示したものである。図から明らかに肝臓からの放射活性の消失は著しく遅い。が、一方肺からの消失は肝臓に比べるとかなり速い。蓄積する小球体量と消失速度は小球体の調製温度に関係している。

180℃で調製した小球体の静脈内投与後の放射活性の消失は、低い温度で調製した小球体の静注後に比べ遅い。前章にも述べた様に、5-FUを含有したアルブミン小球体からの *in vitro* における薬物放出は、放出速度こそは遅いが一週間以上にも渡る。それゆえ、体内に存在するこれら小球体はしだいに分解し、小球体に含有されている 5-FU も放出してゆくものと思われる。これらの結果からアルブミン小球体が徐放性を併せもつ、site-specificな薬物担体であることが考えられる。

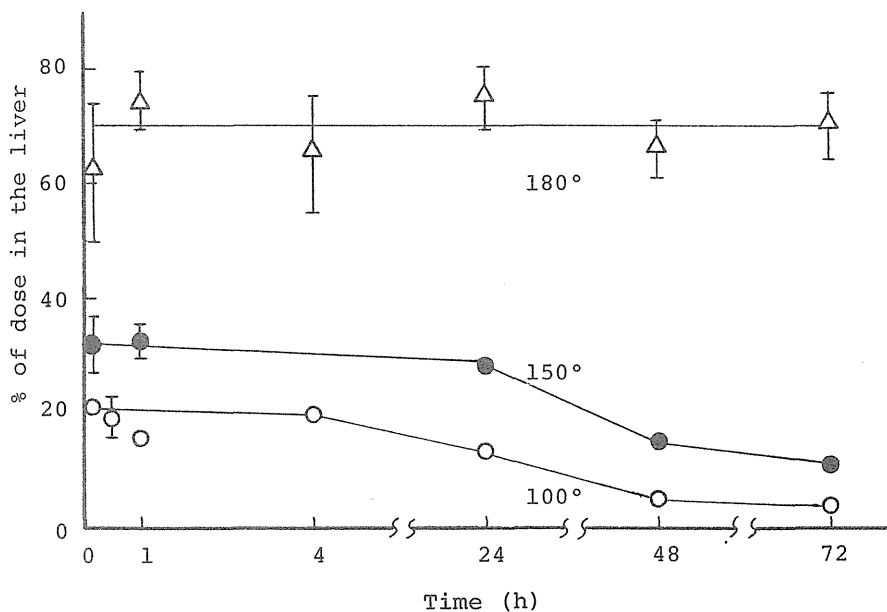


Fig. 19 Time Course of Radioactivity in the Liver after Injection of ^3H -5-Fluorouracil entrapped in Microspheres prepared at 180, 150, or 100°C
Each point represents the mean \pm S.E. of 3-7 measurements.

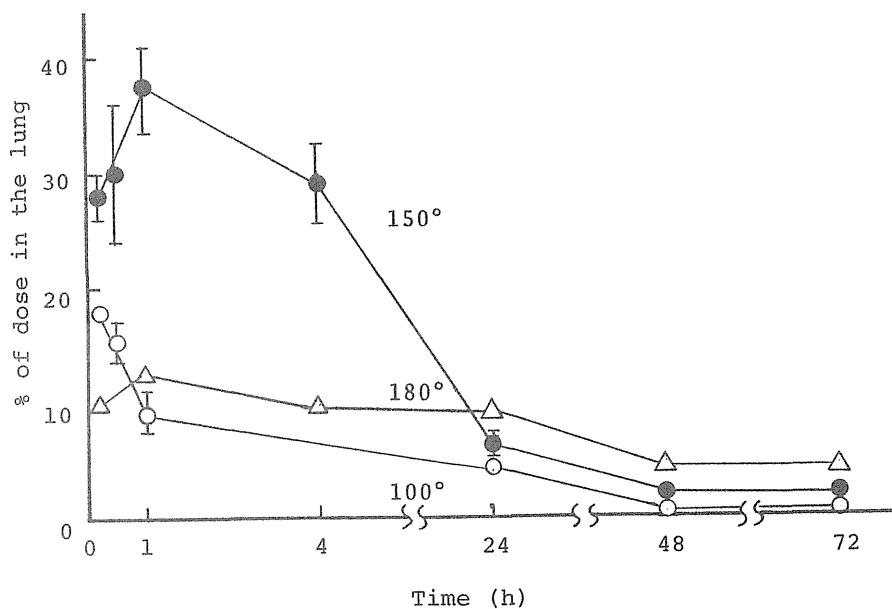


Fig. 20 Time Course of Radioactivity in the Lung after Injection of ^3H -5-Fluorouracil entrapped in Microsphere prepared at 180, 150, or 100°C
Each point represents the mean \pm S.E. of 3-7 measurements.

第5項 食作用飽和による生体内分布の変化

アルブミン小球体（180℃固化、粒子径1 μm 以下）をマウスに静脈内投与すると、主に肝臓に取り込まれたが、食作用を飽和させた動物の場合は投与後どのような挙動を示すか検討するため、薬物を含有しない小球体の前処理の後、薬物を含有した小球体を投与して、その効果を検討した。すなわち、薬物を含有しない小球体をマウスに投与（5 $\text{mg}/0.5\text{ml}$ ）後、5分に薬物含有小球体を投与した。

Fig. 21 は薬物含有小球体を投与後30分における組織内分布を示している。小球体を前処理すると、肺中の取り込みは増加し、一方肝臓や脾臓中の取り込みは減少する。肝臓や脾臓中の小球体の食作用は、小球体の一回目の投与（薬物を含有しない小球体）で飽和したため、小球体の二回目の投与（5-FUを含有した小球体）後、蓄積した薬物は減少したと思われる。一方肺への小球体分布速度は肝臓への分布速度に比べ著しく遅いものの、肝臓への取り込み量が飽和したために、その結果肺への小球体量が増加し、

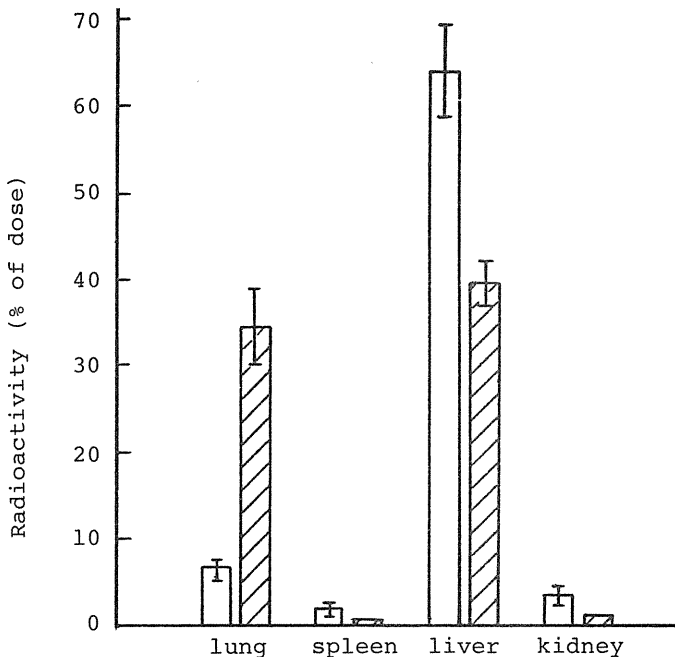


Fig. 21 Effect of Pretreatment with Non-entrapped Microsphere on the Tissue Distribution of Drug-entrapped Microsphere in Mice
□; control
▨; pretreatment non-entrapped microsphere
Each column represents the mean \pm S.E. of 3-7 mice.

蓄積した薬物も増えたものと考えられる。

食作用の飽和はパルミチン酸メチルによっても引き起こされると報告されている。⁴⁰⁾そこでアルブミン小球体の体内分布に対するパルミチン酸メチルの前処理効果を調べた。すなわちパルミチン酸メチルを0.1% (V/V) polysorbate 20 を含有する5%ブドウ糖溶液で懸濁させ (100 mg/ml)、これをマウスに静注 (1.2 mg/kg) 後、24時間目に小球体を投与して、投与後30分の体内分布を測定したが、未処理群と差がなかった。同様にパルミチン酸メチル処理を3日間行った後小球体を投与したが、その体内分布に差はみられなかった。

Tanakaら⁶⁾ がリポゾームに関して同様な実験を行い、肝臓中のリポゾーム取り込み量を減少させていることを考えあわせると、パルミチン酸メチルの取り込み部位と、アルブミン小球体の取り込まれる部位が異なっていることが示唆される。

第6項 担癌動物における生体内分布

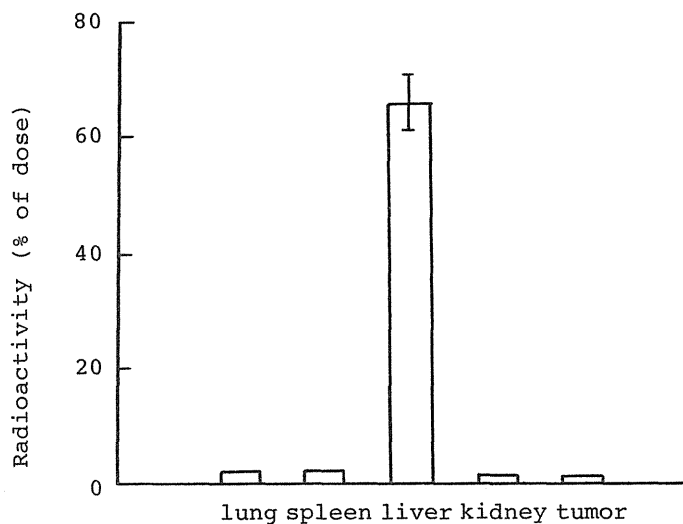


Fig. 22 Tissue Distribution of Radioactivity at 30 min after Intravenous Injection of ^3H -5-Fluorouracil entrapped in Microspheres in Tumor Bearing Mice
Each column represents the mean \pm S.E. of 4 mice.

マウスの Ehrlich 固型癌に対するアルブミン小球体の体内分布を検討するため、この腫瘍マウスに³H-5-FUを含有したアルブミン小球体（180℃固化、粒子径1μm以下）を静脈内投与（5mg/0.5ml）して腫瘍内のトリチウム量を測定した。Fig.22は腫瘍マウスにおけるトリチウムの分布を示している。小球体は腫瘍細胞には集まらず、放射活性のほとんどは肝臓に集まった。

第4節 小括と考察

直径1μm以下のアルブミン小球体をマウスやラットの様な小動物に静脈内投与すると、そのほとんどは肝臓に分布した。ヒトに応用すれば肝臓中の分布量は、これら小動物の結果より高い値となり、投与量の90%以上が細網内皮系に集中するものと考えられる。また肝臓への小球体取り込みは速く、ほぼ5分以内に完了すると思われ、それ以後は小球体並びに含有薬物は血中にはみられない。¹⁹⁾

一方、粒子径を大きくすれば、肺への分布が高くなる。ヒトにおける応用では、ここで実験したL小球体（平均粒子径、約11μm）より大きくなくてはならないが、スキャンング剤としての臨床応用から、約30μm程度で投与量の90%程度が肺に分布すると考えられる。

この肝臓や肺への選択的体内分布挙動は、主に生体にとって異物である小球体の粒子径に依存している。同様な現象がポリスチレンジビニルベンゼン小球体を用いた Kanke ら⁴⁹⁾の報告や、またヒト血清アルブミン小球体をスキャンング剤としてヒトに用いた研究¹²⁾や家兎やマウスを用いた実験¹⁹⁾にみられることから、この現象は用いた物質や蛋白種にさほど影響されないのではないかと思われる。

このように粒子径を調節すれば、小球体は肝臓や肺にそれぞれ選択的に分布する。したがってアルブミン小球体に薬物を含有させて肝臓や肺の疾患に応用すれば、他の臓器や組織への副作用を著しく減少することになりその有用性が期待される。

更に、細網内皮系だけでなく癌細胞自体もアルブミン小球体のような異物の phagocytic activity が高いといわれている。Gregoriadisら³⁹⁾はリポゾームの選択的取り込みがほとんどの臓器の腫瘍部位に観察されたことを報告している。リポゾームのそのような選択的局在性は腫瘍部位広範囲に引き起こされる血管新生とか endocytic activity の増加、またもしくはその両方によって病理部位におけるリポゾームの取り込みが増加したことによって説明される。しかし Newton は⁵⁰⁾腫瘍の色素取り込みが弱

いことを報告している。腫瘍細胞への薬物や薬物担体の取り込みは簡単な過程ではなく、腫瘍の発生部位や種類によっても変化する複雑な過程であることが考えられる。Fig. 22に示したような Ehrlich 癌がマウスの背中に出来た場合は、血管新生も少なく、静脈内に投与されたアルブミン小球体は腫瘍部位に取り込まれるより早く肝臓に分布したと考えられる。従ってこの種の癌には、投与経路や投与部位を考慮し、肝臓に小球体を取り込まれる前に処理しなければならない。第3章にこの Ehrlich 固型癌に対する、アルブミン小球体の腫瘍内投与の効果について述べる。

しかしこれまでの結果から、標的部位が肝臓や肺にある、肝血管肉腫や血管転移性肺癌などには、制癌剤を含有したアルブミン小球体の静脈内投与が有用であることが予想された。

第 3 章

Ehrlich腹水癌及び固型癌に対する 5-fluorouracil 含有小球体の抗腫瘍効果^{51,52)}

第 1 節 緒 言

制癌剤による化学療法を行う場合は、目的の場所で薬物が有効量あり、しかも十分な時間その有効濃度を保たなければならない。Zubrod も⁵³⁾ 癌の化学療法では目的部位における有効濃度だけでなく作用時間も重要で、その両者の積が問題であることを指摘している。特に 5-FU のような濃度依存性の少ない抗癌剤⁵⁴⁾を治療に用いた時は、標的臓器中での薬物濃度の持続ということは癌化学療法の大きな課題といえよう。

また、より効果的な化学療法を確立するためには正常細胞と癌細胞との間の選択性を十分に認識した治療を行うことが必要になると思われる。すなわち、細胞の食作用 (phagocytosis) ないし飲作用 (pinocytosis) によって取り込まれた物質がライソゾーム内の酵素で消化分解されるという事実は、ある種の癌細胞が比較的高い細胞内取り込み作用を有していることを想起する時、癌細胞の死を目的とする治療において重要な示唆を与えるばかりでなく、制癌効果を有する多くの物質を癌細胞に誘導し、効果を増強させるための興味ある手段を提示している。もし薬物を含んだ担体がこれら細胞内に取り込まれるならば、正常組織に与える影響が軽減され、かつ選択的に癌細胞だけを殺すことが可能となる。^{9,10)}

この見地にたって本章では実験動物癌に対する抗腫瘍効果と、腫瘍部位中の薬物挙動の関係を中心に述べ、制癌剤をより効果的に利用するための薬物担体として、アルブミン小球体が、制癌剤の標的性及び徐放性に対していかなる寄与をするかについて考察を加えた。

第 2 節 実験材料及び方法

実験材料：アルブミン小球体の調製法と調製に用いた薬物等は第 1 章、第 2 章と同様である。なお本章で用いた 5-FU 含有小球体は 150 °C で固化調製したもの、粒子径は 1 μ m 以下である。

実験動物及び担癌動物作成法：実験動物には JCL-I CR 系の雄性マウス 30 匹前後のものを使用した。Ehrlich 腹水癌及び固型癌マウスの作成法は前章に記載した。

腹腔内及び固型癌内の小球体並びに薬物挙動の測定：マウスに Ehrlich 腹水癌細胞 2×10^7 個を腹腔内、または右腋窩皮下に移植し、腹水癌または固型癌を作成する。7 日目に非放射性 5-FU を含有する 125 I-標識アルブミン小球体、 3 H-5-FU 含有非標識

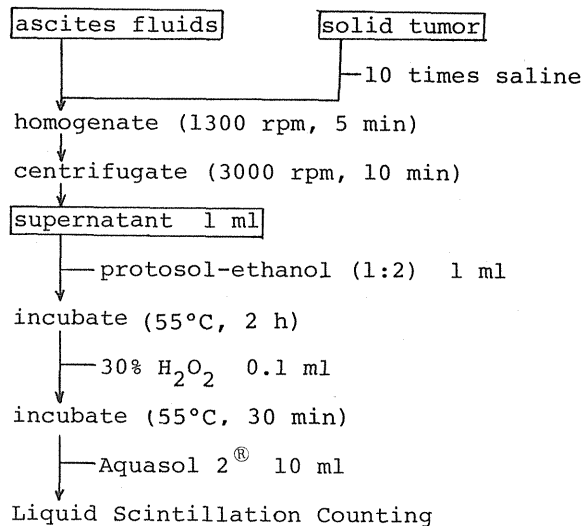


Chart 3 Determination of Tritium
Radioactivity in Ascites
or Solid Tumor

小球体もしくは遊離 ^3H -5-FU を腹腔内または固型癌内に投与（5-FU の投与量は全て 0.5 mg / マウス）した。経時的にマウスを殺し、腹水または固型癌を採取し、 ^{125}I -放射活性はそのままオートガンマカウンターで測定、 ^3H -放射活性は Chart 3 の様に処理後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

細胞数測定法：マウスに 2×10^7 個の Ehrlich 腹水癌細胞を腹腔内に移植し、その24時間後に小球体または5-FU水溶液（それぞれ 0.5 mg の5-FUを含む）、そしてコントロールとして生理食塩水 0.5 ml を投与した。上記のように3群に分類したマウスを接種後5、7及び10日に殺し、腹水を全て採取した。腹水液量を測定したのち、その腹水癌をトリパンブルーで染色してトーマの血球計算盤で色素不染の生細胞をカウントした。

腹水癌の形態学的検討法： 2×10^7 個の Ehrlich 腹水癌を接種後24時間に5-FU含有小球体または生理食塩水を投与し、移植5日後に腹水を採取し、Chart 4 にしたがって固定、脱水した試料を、酢酸イソアミル中に懸濁し、臨界点乾燥装置（日立、モデルHCP-2）で乾燥、次にイオンコーター（エイコー・エンジニアリング、モデル1B-3）で蒸着し、走査型電子顕微鏡（日立、モデルS-430）を使って観察した。

腹水癌マウスに対する小球体の抗腫瘍効果の検討方法：小球体の一回投与時の効果の検討は、マウス腹腔内に 2×10^7 個の Ehrlich 腹水癌を移植し、24時間後、小球体、遊離5-FU（5-FUとしてそれぞれ 1 mg ）またはコントロールとして生理食塩水を投与した3群（各群10匹）に分類した。これら処理を施したマウスの体重を毎日測定し、生存日数も同時に記録した。なお抗腫瘍効果の指標として用いた T/C % は対照群動物の平

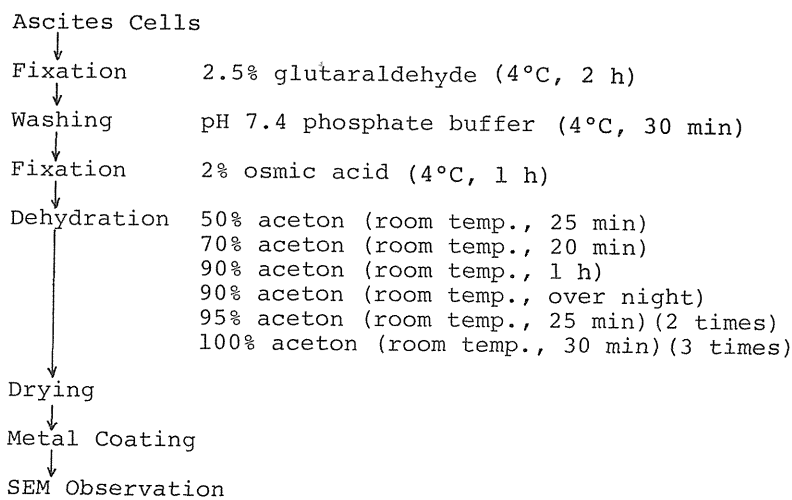


Chart 4 Specimen Preparation Procedure for
 Scanning Electron Microscopy

均生存日数(C)に対する治療群のそれ(T)の百分率である。⁵⁴⁾

小球体多数回投与時の効果の検討は、移植 Ehrlich 腹水癌数が 1×10^6 個、投与量が 5-FU としてマウス一匹あたり 0.5 mg、投与日を接種後 1, 5, 9 日とした。

固型癌に対する小球体の抗腫瘍効果の検討方法：マウスの背中皮下に Ehrlich 腹水癌細胞 2×10^7 個を接種し、その24時間後に 0.1 ml の小球体、遊離 5-FU（それぞれ 5-FU として 0.5 mg）または生理食塩水を投与した（各群10例）。接種後 7 日から毎日ノギスを用いて腫瘍体積（縦×横×高さ、mm³）を測定し、増殖抑制効果を検討した。

多数回投与の場合投与は接種後 1, 5, 9 日に行った。

第 3 節 実験結果

第 1 項 小球体投与後の 5-fluorouracil の消失

生体内でのアルブミン小球体からの徐放性を証明するために、Ehrlich 腹水癌を接種したマウスの腹腔内に小球体を投与して、小球体から腹水中への薬物放出を検討した。Fig.23に腹水中から小球体及びそれに含有された薬物の消失結果を示した。Fig.23a は ¹²⁵I-標識した小球体を使用して、小球体自体の消失をみたもので、同b は ³H-5-FUを含有した小球体を使用して、小球体から遊離した ³H-5-FUに起因する放射活性値を示した。また b 図には遊離 ³H-5-FUを投与後の挙動も併記した。遊離 5-FU の代謝及び消失は速く、注射後24時間に腹水中に存在しているトリチウム放射活性の割合は投与量の 0.93 % にすぎなかった。³H-5-FUを小球体に含有させて投与した群の小球体から放出、溶出した 5-FUに起因する放射活性は、5-FU 単独投与時に比べ比較的ゆっくり消失し、投与後24時間で投与量の 2.46 %、48時間でも 1.31 % 存在していた。一方アルブミン小球体は投与後24時間でも、ほとんど腹水中から消失していなかった。

これらの結果から、腹水癌中におけるアルブミン小球体の分解は非常に遅く、それ故小球体から徐々に放出する 5-FU は Ehrlich 腹水癌に徐々に作用すると考えられる。

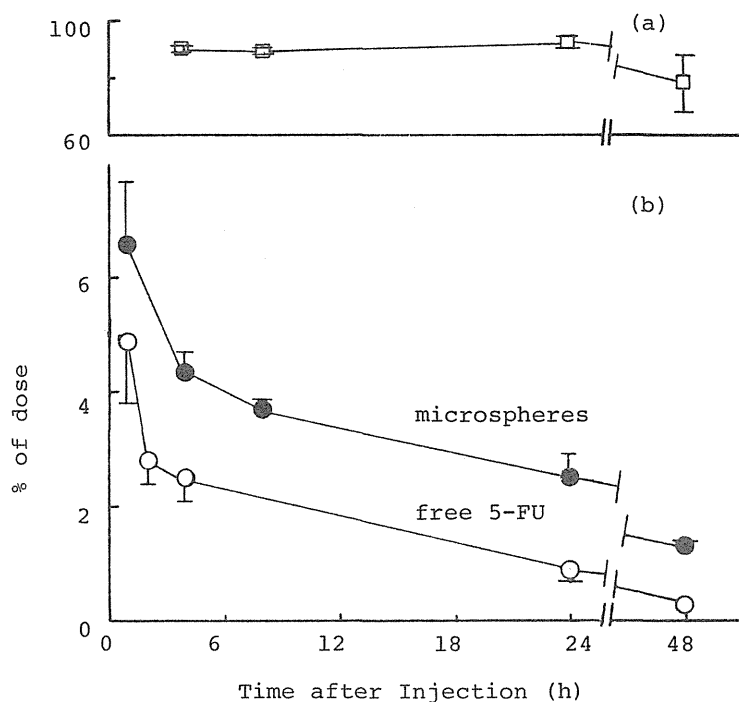


Fig. 23 5-Fluorouracil and Albumin Microsphere Levels in Ascites Fluid after administration of Free or Microsphere-entrapped 5-Fluorouracil

Results are expressed as the mean \pm S.E. of 3 mice.

第2項 小球体一回投与による抗腫瘍効果

小球体の *in vitro* 放出実験の結果 (第1章 Figs. 8, 9) から推定されたように、*in vivo* すなわち Ehrlich 腹水癌マウスの腹腔内においても小球体から薬物が持続的に放出されることが前項で示された。本項では、この持続的薬物放出による薬理効果及び小球体と腹水癌との相互作用について、次の四項目を検討した。

- (1) 小球体投与後の Ehrlich 腹水癌の形態学的検討
- (2) 担癌マウスの体重増加抑制効果
- (3) 細胞成長阻害効果
- (4) 生存日数

(1) 小球体投与後の Ehrlich 腹水癌の形態学的検討

5-FUを含有したアルブミン小球体を担癌マウスの腹腔内に投与すると、Fig. 24で

見られるような形態変化を腹水癌細胞に起こすことが認められた。

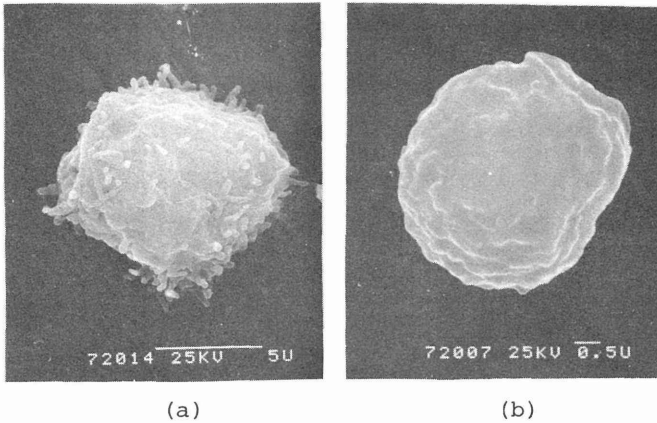


Fig. 24 Scanning Electron Micrographs of
Ehrlich Ascites Carcinoma
(a) control (x6200), (b) after treatment
with albumin microspheres containing 5-
fluorouracil (x14000)

すなわち、投与後のものでは細胞表面に本来見られる microvilli が顕著に減少しているか、あるいは全く見られないという現象が観察された。このような変化は 5-FU の腹腔内濃度の持続によるのか、あるいは腫瘍細胞の強い細胞内取り込み活性によって高まった 5-FU の細胞内濃度によるのか、またはその両方の作用によって引き起こされたと考えることができる。

(2) 担癌マウスの体重増加抑制効果

次に、5-FU 含有小球体の抗腫瘍効果を遊離薬物と比較するために同様の癌モデルを用いて検討した。腹水癌が増殖しはじめると、それにつれてマウスの体重も増加していくので、⁵⁵⁾ この現象を指標に実験を行った。

Fig.25は 2×10^7 個の Ehrlich 腹水癌細胞をマウスに腹腔内接種24時間後に、5-FU 含有小球体、遊離薬物、並びに生理食塩水を投与して、その後の動物の体重変化を測定したものである。なお比較のために健康マウスの体重変化を併記した。担癌マウスはその著しい癌細胞の増殖のために体重は一週間後で癌接種時の約 1.3 倍、二週間後で約 1.4 倍となった。遊離の 5-FU を投与しても、生理食塩水投与群と同様で、全く効果が認められなかった。これは遊離薬物の消失が非常に速いためだと考えられる。

しかし、小球体を投与した群においては、癌接種一週間後でも体重増加はほとんどみられなかった。外見上からもこの時点のマウスでは腹水貯留を観察することはできな

った。しかし、小球体投与後一週間を経過すると体重増加が始まり、以後急激に増加していった。これは放出できる薬物量が減少し、そのため腹腔内の薬物レベルが低下し、癌細胞の増殖を阻止できなくなったためだと考えられる。

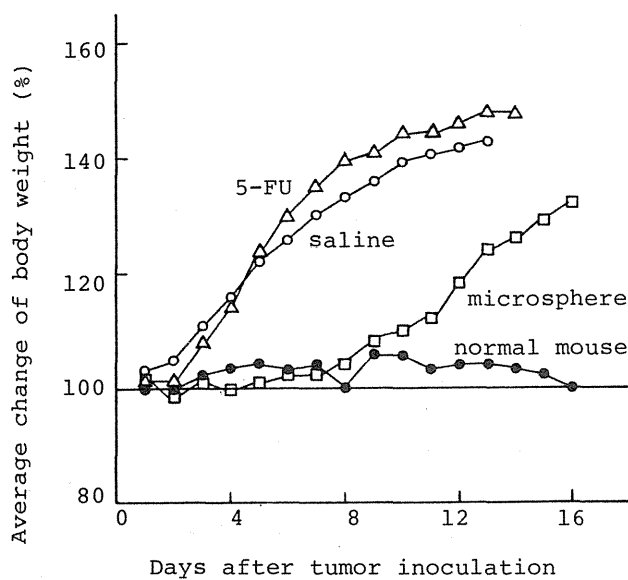


Fig. 25 Change in Body Weight of Ehrlich Ascites Carcinoma-bearing Mice
Results are expressed as the mean values of 10 mice.

(3) 細胞成長阻害効果

上記と同様な処理を施したマウスの生細胞数についても調べた。Fig.26は腹水容積と生細胞数について検討した結果である。

生細胞数は腹水容積の増加につれて、やはり増加するのが見られた。Fig.26に示すように、小球体投与群は他の群よりもすぐれた増殖抑制効果を有していると考えられ、生理食塩水投与群との比較ではその生細胞数において有意差が認められた（ t -検定、5日； $P < 0.001$ ，7日； $P < 0.05$ ，10日； $P < 0.02$ ）。しかし遊離の5-FU投与群は生理食塩水投与群と比較しても有意差は少なかった（5日； $P < 0.01$ ，7及び10日；有意差なし）。

この結果、5-FUは時間依存性のある制癌剤であるため、⁵⁴⁾ 癌細胞成長阻害は消失の速い遊離の5-FUより小球体の方が高いことが認められた。

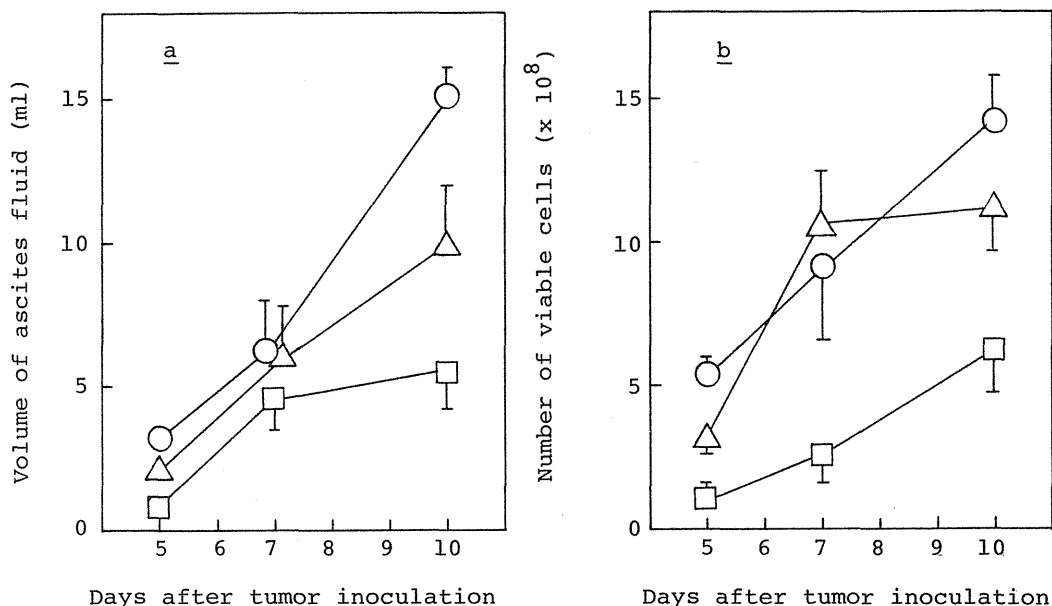


Fig. 26 Effect of Free and Albumin Microsphere-entrapped 5-Fluorouracil on the Ascites Volume and Ehrlich Ascites Cell Count in Mice. Treatment with 0.9 % NaCl solution (○), free 5-fluorouracil (△), and microsphere-entrapped 5-fluorouracil (□). Results are expressed as the means \pm S.E. of 5 mice.

(4) 生存日数

Fig. 27と Table Vは先の処理を施したマウスの生存日数を比較したものである。

このように、生存日数に関しても同様の増加が認められた。小球体処理したマウス群においては60日以上生存したマウスが一例みられ、対照群マウスの平均生存日数(C) に対する治療群の平均生存日数(T) の百分率(T/C%)は 121%(9例)であった。また遊離 5-FUによる T/C%は 101%であった。

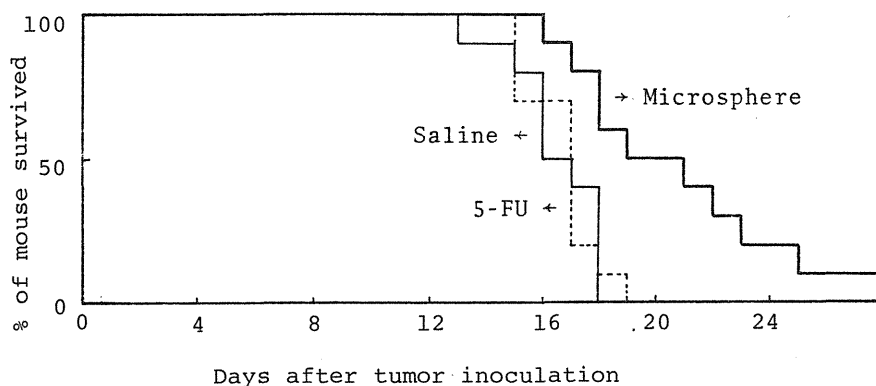


Fig. 27 Effect of 5-Fluorouracil entrapped in Albumin Microsphere on the Survival of Mice inoculated with Ehrlich Ascites Carcinoma

Table V Effect of 5-Fluorouracil entrapped in Albumin Microsphere on the Survival of Mice inoculated with Ehrlich Ascites Carcinoma

	survival days	T/C %	number of mice survived/treated
control	16.5 ± 0.5	-	0/10
free 5-fluorouracil	16.7 ± 0.4	101	0/10
microsphere-entrapped 5-fluorouracil	19.9 ± 1.0 ^{*1} (23.9 ± 4.1) ^{*2}	121 ^{*1} (144) ^{*2}	1/10

*1 calculated with 9 mice not survived for 60 days

*2 calculated with 10 mice

第3項 小球体多数回投与による抗腫瘍効果

一回投与による結果から、Ehrlich 腹水癌の化学療法において、持続的薬物放出による制癌効果が認められた。

しかし一回投与による治療では十分なものとはいえなかった。この原因としては一週間程度で小球体中の薬物含量が低下してしまうため、腹腔内の薬物量が涸渇してしまうからだと推定される。そこで、著者は小球体を連続投与することで薬物レベルを維持し、

治療効果を上げることがを試みた。結果は体重変化と生存日数を指標に示した。

(1) 体重増加抑制効果

Ehrlich 腹水癌接種後、1, 5 及び 9 日後に小球体及び遊離薬物を投与し、前項の実験と同様に体重増加率を生理食塩水投与群と比較した。

Fig. 28に示すように、小球体の多数回投与後の体重増加率は遊離 5-FUや生理食塩水の多数回投与時よりも有意に低く（小球体／生理食塩水, $P < 0.05$ ；投与後9日以降、小球体／遊離 5-FU, $P < 0.05$ ；投与後12日以降）、小球体の多数回投与時における効果が遊離薬物の多数回投与に比べても著しく優れていた。

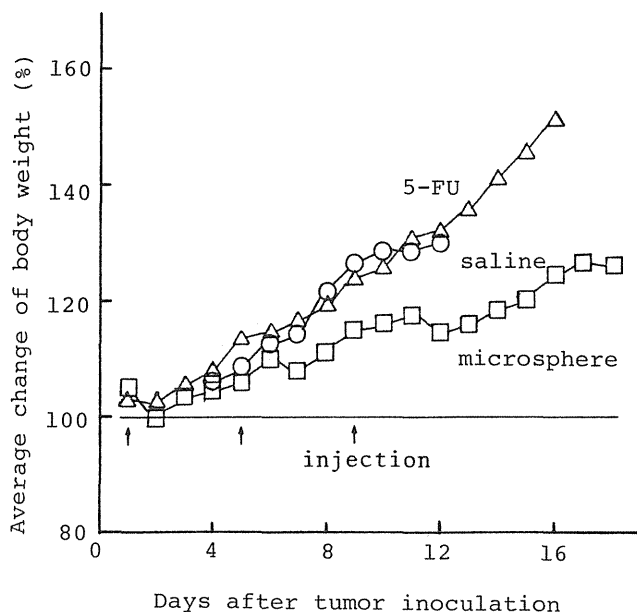


Fig. 28 Change in Body Weight of Ehrlich Ascites Carcinoma-bearing Mice after Multiple-shot Administration of Free or Albumin Microsphere-entrapped 5-Fluorouracil

Results are expressed as the mean values of 10 mice. Arrows indicate the administration of 0.9 % NaCl solution, free or microsphere-entrapped 5-Fluorouracil

(2) 生存日数

生存日数の増加 (T/C%) は小球体の一回処理で 121%であったのに対し、多数回投与では 162%と約40%も改善された (Fig. 29, Table VI)。なお小球体処理したマウ

ウスにおいては60日以上生存したものも1例みられ、遊離 5-FUで処理したマウスのT/C%は 119%であった。これらの結果から、5-FUを含有したアルブミン小球体の多数回投与が癌の化学療法でも有効であることが示唆された。

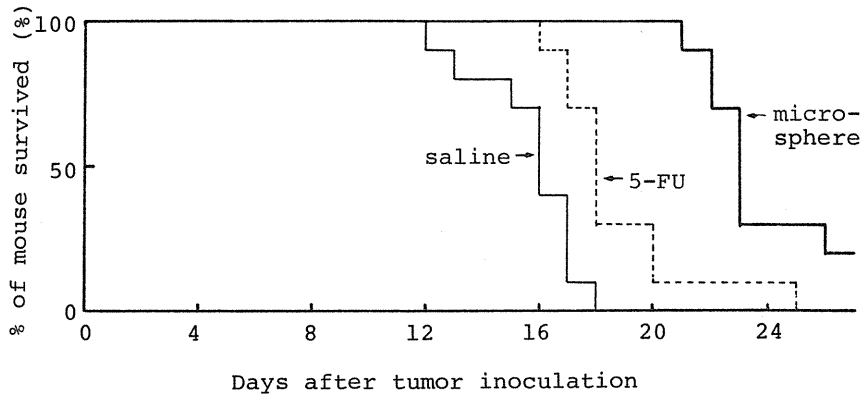


Fig. 29 Effect of Multiple-shot Administration of Free or Albumin Microsphere-entapped 5-Fluorouracil on the Survival of Mice inoculated with Ehrlich Ascites Carcinoma

Table VI Effect of Multiple-shot Administration of Free or Albumin Microsphere-entrapped 5-Fluorouracil on the Survival of Mice inoculated with Ehrlich Ascites Carcinoma

	survival days		T/C %	number of mice survived/treated
control	15.7	0.6	-	0/10
free 5-fluororucil	18.7	0.8	119	0/10
microsphere-entrapped 5-fluorouracil	25.4 (28.9)	2.6*1 4.2)*2	162*1 (184)*2	1/10

*1 calculated with 9 mice not survived for 60 days

*2 calculated with 10 mice

第4項 小球体投与後の固型癌中の5-fluorouracilの消失

長期間にわたって薬物を癌病巣に対して供給することは治療上における大きなメリットになると考えられる。Fig. 30は ^{125}I -標識した小球体、または ^3H -5-FUを含有する小球体を直接腫瘍内に注入した後に、腫瘍内の ^{125}I で標識した小球体 (Fig. 30 a図) と、小球体から固型癌中に放出されたトリチウムの放射活性 (同 b 図) を経時的に測定した結果を示したものである。なお図には遊離 5-FU 投与後の挙動を併記した (b 図)。

トリチウムレベルに関して比較すると、遊離薬物の投与では1時間後ですでに低い値となっていて、24時間後にはほとんど消失してしまっている。一方、小球体の投与では48時間後でも腫瘍内に放射活性を認めることができた。固型癌細胞は腹水癌細胞の様に腹水中を浮遊しているものではなく、腫瘍は正常組織間に着床、増殖しているものと考

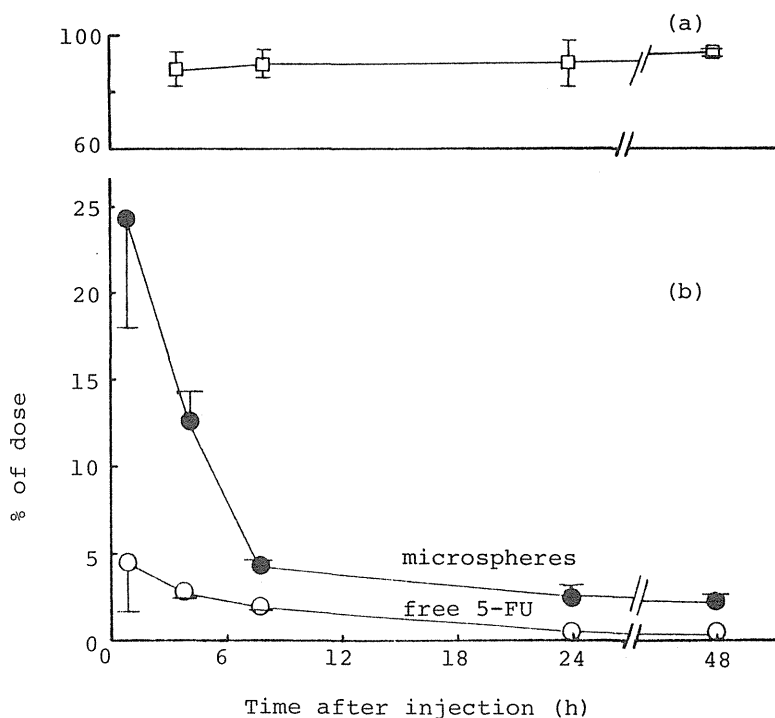


Fig. 30 5-Fluorouracil and Albumin Microsphere Levels in the Tumor after Administration of Free or Microsphere-entrapped 5-Fluorouracil
Results are expressed as the mean \pm S.E. of 3 mice.

えられるので、小球体投与時のトリチウム及び ^{125}I の消失は腹水型腫瘍に比べても非常に遅い(第1項、Fig. 23参照)。この結果は小球体から薬物が持続的に固型癌中に放出されていることを示唆している。

第5項 小球体一回投与による固型癌増殖抑制効果

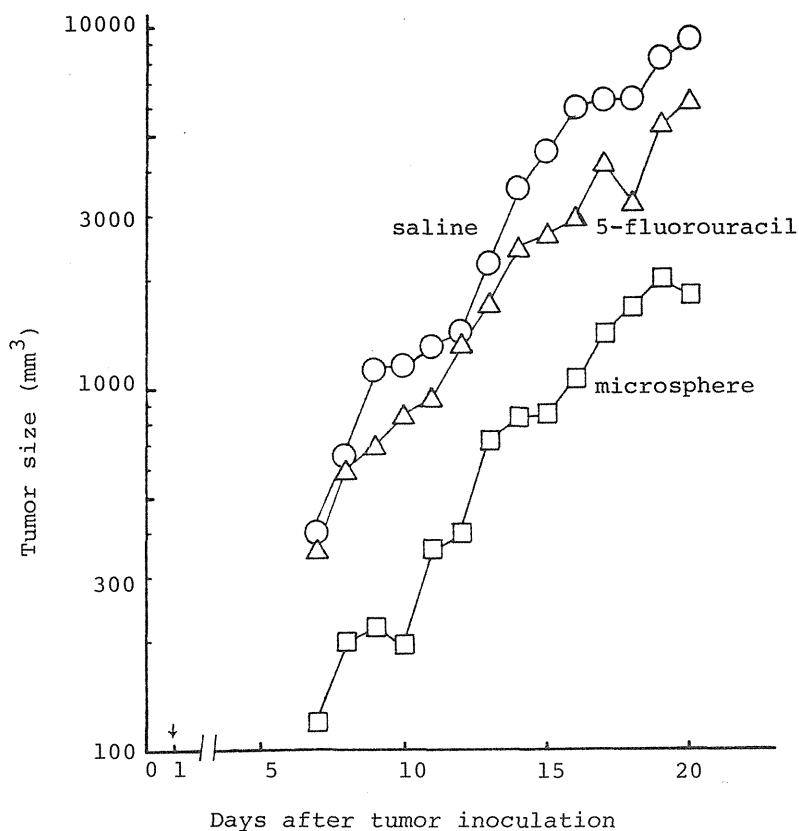


Fig. 31 Effect of Single-shot Administration of Free or Microsphere-entrapped 5-Fluorouracil on the Growth of Ehrlich Solid Tumor

Each point represents the average of 10 mice. The arrow indicates the administration of 0.9 % NaCl solution, free or microsphere-entrapped 5-fluorouracil

前述した腹水癌の実験と同様に小球体は固型癌中に長く滞留し、薬物を徐々に放出することが確認されたが、本項ではこの徐放性の効果を腫瘍体積増加の抑制を指標に検討した。^{57,58)}

Fig. 31は Ehrlich 固型腫瘍の増殖に対する遊離 5-FU 及び 5-FU を含有した小球体の影響を示したものである。接種後10日の小球体投与群の腫瘍体積は生理食塩水投与群や遊離 5-FU 投与群のそれと比較して約 1/5，接種後20日では約 1/10 であって、明らかに小球体の効果に有意性のあることが認められた。

腫瘍部位における細胞増殖に対するこの抑制効果は、アルブミン小球体からの 5-FU の徐放性に依存していると思われる。

第 6 項 小球体多数回投与による固型癌増殖抑制効果

前項において一回投与時の Ehrlich 固型癌に対する 5-FU 含有小球体の有効性について検討し、小球体からの薬物放出による腫瘍の増殖阻止効果を認めたが、本項において実際の臨床治療を想定した多数回投与の有効性について検討し、癌化学療法に対しての薬物担体の利用に関する基礎的知見を得ることを目的として本実験を行った。

薬物の投与は接種後 1，5 及び 9 日に行った。その結果小球体投与群では長期間にわたって腫瘍体積の増加に抑制が認められた。一方、遊離 5-FU 投与群でもその増殖過程の初期にはかなりの抑制効果があると考えられるが、接種後10日を経過する頃から活発な癌細胞の増殖を抑制することはできず、腫瘍体積は急激に増加するのが観察された。Fig. 32は多数回投与した場合の腫瘍体積を示したもので、小球体投与群の腫瘍体積が遊離 5-FU 投与群や生理食塩水投与群に比較して一定であるのが認められた。

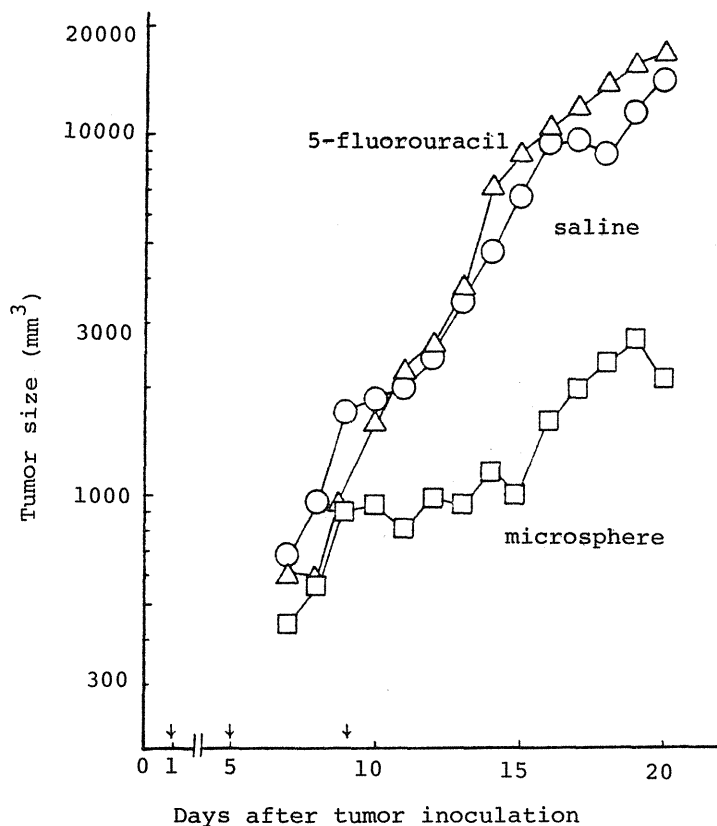


Fig. 32 Effect of Multiple-shot Administration of Free or Microsphere-entrapped 5-Fluorouracil on the Growth of Ehrlich Solid Tumor

Each point represents the average of 10 mice.
Arrows indicate the administration of 0.9 % NaCl solution, free or microsphere-entrapped 5-fluorouracil

第4節 小括と考察

小球体からの薬物放出は *in vitro* に限らず、生体内例えば Ehrlich 腹水癌マウスの腹水中でも長く持続し、体内からの消失速度が非常に速い 5-FU (第2章、Figs.15, 16) 等の場合は、アルブミン小球体を用いることによって薬物濃度と薬効の持続化が期待される。

癌化学療法の領域において、薬物担体の有効性を検討する場合、担癌動物を用いた実験が必須のものと考えられるが、腫瘍部位中の薬物濃度と抗腫瘍効果の関連性について述べた報告は多くを見ない。^{59,60)} 本章において示した Ehrlich 腹水癌マウスに対する 5-FU 含有小球体の抗腫瘍効果は、同量投与した遊離薬物よりも持続的に癌細胞に作用したため高くなったと考えられる。

また固型癌に対する 5-FU 含有アルブミン小球体の一回または多数回投与では、遊離薬物処理に比べ、あきらかな腫瘍増殖阻止効果を見出したが、これも小球体からの 5-FU の持続的放出に起因するものと思われた。

5-FU は臨床では非経口的に多くの腫瘍に用いられているが、⁶¹⁾ この薬剤はむしろ経口投与の方が毒性が少ないといわれている。⁶²⁾ したがって 5-FU を用いて治療する場合、この薬物の毒性を減じる意味からも 5-FU の徐放性製剤となるアルブミン小球体が明白な抗腫瘍効果と低い副作用をもつ、新しい投与形態になることが期待される。

なお、今回小球体調製に用いたアルブミンは牛血清由来のもので、ヒトに応用するためには、免疫学的問題からもヒト血清由来のものを使用すべきである。マウス Ehrlich 癌を治療する場合も、マウス血清アルブミンを使用した場合は、本章で述べた抗腫瘍効果に変化が生じるかも知れない。今後被験動物（被験者）と同じ血清アルブミンを用いて、更に検討が必要と思われる。

第 4 章

AH7974 転移肝癌に対する adriamycin 含有小球体の抗腫瘍効果⁶³⁾

第 1 節 緒 言

食道、胃、大腸など門脈で灌流される消化器に原発する癌は、その進行過程で肝転移をきたすことがある。時に各消化器癌の手術時において、物理的振動から遊離癌細胞が生じ、これが門脈を経由して肝転移をおこすことがある。従って最近は外科手術の補助療法 (adjuvant chemotherapy) として制癌剤を併用するようになって来た。ところがこの制癌剤は癌の転移部位のみに分布するわけではなく、他の薬剤と同じようにその物理化学的性質に依存して、程度の差はあるが全身に分布する。このことは抗腫瘍効果の低下と副作用の発現を引き起すことになる。それ故、アルブミン小球体により上記の欠点を可能な限り軽減させることは臨床的に非常に意義のあることである。in vivo 実験においてそれらの点を確認するため、本章では胃癌手術時の肝転移を想定して、アルブミン小球体の体内分布と抗腫瘍効果について検討を加えた。実験モデルは AH7974 細胞をラット門脈に接種して作成した転移肝癌を選び、含有薬物は AH7974 細胞に対して効果が高いといわれている⁵⁵⁾ ADMを用いた。

以下その結果を報告する。

第 2 節 実験材料及び方法

実験材料：ADMと³H (G) - ADM は協和醗酵から分与されたものを使用した。³H(G) - ADMの化学的純度は薄層クロマトグラフィー (TLC) で約98%、比活性は 45.1 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ であった。ADM含有小球体の固化温度は 170 $^{\circ}\text{C}$ 、粒子径は Fig. 7 とほぼ同様であった。他の材料はこれまで述べたものと同様である。

実験動物：実験動物は雄性Donryuラット、体重 150 g 前後のものを使用した。
AH 7974 腹水癌の植えつきは希釈しない 10^7 個の腫瘍細胞を含む約 0.1 ml の腹水を約 7 日毎に移植して継代した。

AH 7974 転移肝癌の作成法：ラットにペントバルビタールナトリウム麻酔下 ($60\text{mg}/\text{kg i. p.}$) に開腹し、AH 7974 細胞 10^6 cells / 0.1 ml を 30 G (ゲージ) 注射針にて門脈内注入したのち、軽い指圧下に出血を止め、開腹部を縫合し、縫合部に感染防止のためクロロマイセチン軟膏 2 % (三共) を塗布した。

佐藤ら⁶⁴⁾はラットの腹水肝癌肉腫、すなわち AH 13, 41C, 44, 60C, 66, 66F, 109 A, 130, 272, 7974 を 10^7 個ラット尾静脈内に移植して、転移を形成する場所を調べた。その結果 100 % 自由細胞の AH 13, 66F ではほぼ全身に転移をおこし、白血病様の浸潤を作ること、逆に AH 66, 7974, 60C ではほとんど肺のみに浸潤したことを報告している。今回の転移肝癌のモデル細胞は肝臓のみに転移をきたすものが理想的であるので、後三者の腹水肝癌に対して薬物である ADM の効果や細胞数の算定に比較的便利なものから AH 7974 細胞を選んだ。なお接種細胞数は移植率、平均生存日数 (後述) 等を考慮して一匹あたり 1×10^6 個とした。

小球体投与後の小球体及び薬物挙動の測定：非標識 ADM 含有 ^{125}I - 小球体、 ^3H (G) - ADM 含有非標識小球体 (2mg の小球体, $300\text{ }\mu\text{g}$ の ADM 含有)、または遊離 ^3H (G) - ADM の生理食塩水溶液をラット門脈に投与する。投与後 10 分、1 時間及び 1 日に 1 ml の血液を心臓から採取し、その後ラットを殺して開腹し各臓器 (心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓及び小腸) を取り出し、重量測定。 ^3H と ^{125}I の測定法は前章と同様である。

なお肝臓中の小球体から遊離した ^3H (G) - ADM の定量は次の方法で行った。²¹⁾ 肝臓を 3 倍量の生理食塩水でホモジネートし、うち 2 ml に除蛋白剤として 16.5 % AgNO_3 を 1 ml 加える。20 分間激しく振とう後、1500 rpm、10 分遠心し、上清を自動燃焼装置で燃焼後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

転移肝癌に対する小球体の抗腫瘍効果の検討法：AH 7974 転移肝癌に対する ADM 含有小球体の効果を延命効果から検討した。コントロール群として 10^6 個の AH 7974 細胞をラット門脈に接種した。処理群として $300\text{ }\mu\text{g}$ の ADM または $300\text{ }\mu\text{g}$ の ADM を含有する 2mg の小球体を AH 7974 細胞と同時に門脈に投与した。これら 3 群は全て一群 10 匹とした。また薬物を含有しない小球体 (2mg) も比較のため 5 匹に AH 7974 細胞と同時に処理した。

効果の検討は 60 日生存ラットの数と T/C % によった。

転移肝癌の組織学的検討：AH 7974 転移肝癌の組織学的検討は、コントロール群とし

て 10^6 個の癌細胞を門脈内投与、小球体処理群として 10^6 個のAH癌と $300\mu g$ のADMを含有した $2mg$ 小球体を併用投与した。それぞれ10分、3日、10日に肝臓を取り出しホルマリン固定後、薄切、ヘマトキシリン・エオシン重染色を行った。なお比較のため健康ラットの肝臓も同様に処理した。

第3節 実験結果

第1項 小球体門脈投与後の adriamycin の消長

所属動脈や門脈への薬物投与は、その所属臓器中に高濃度の薬物を直接通過させるので、目的とする部位への薬物濃度を高めるのに有用な手段と考えられる。特に胃癌等の手術時には腹部切開が伴うので、門脈への薬物投与を比較的簡単に行うことが出来る。

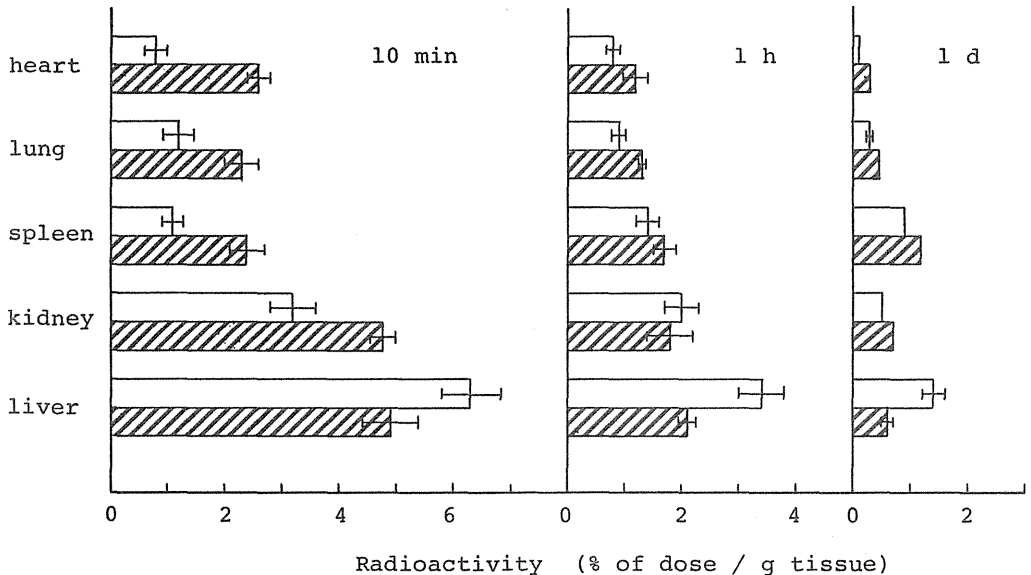


Fig. 33 Tissue Distributions at 10 min, 1 h, and 1 d after Injection of Free $^3H(G)$ -Adriamycin.
 ▨ ; intravenous injection, □ ; intraportal injection
 Each column represents the mean \pm S.E. of 4-7 rats.

Fig. 33はトリチウムで標識したADM ($^3\text{H}(\text{G})\text{-ADM}$) をラットに静脈内投与または門脈内投与後10分、1時間及び1日後の各臓器中の放射能の分布を示したものである。ADMの代謝は弱く長く活性型のままとどまると考えられているので⁶⁵⁾ 図中の放射能量はほぼ未変化ADMを示していると考えられる。投与ルートを変えて尾静脈から門脈に変えることにより、投与後10分におけるADMの分布は3.9%/g liver から6.3%/g に増加した。門脈投与後の血中濃度は低く、図に示した全臓器中濃度より低かった。またADMの副作用⁶⁶⁾ が重篤に表われる心臓中の薬物量は門脈投与することによって低くなるので副作用を防止するという意味からも、ADMを静脈投与するより門脈内投与した方が有用だと考えられる。

次に小球体の分布を調べた。Fig. 34は非標識ADMを含有した ^{125}I -標識小球体、または $^3\text{H}(\text{G})\text{-ADM}$ を含有した非標識小球体を門脈内投与した後の ^{125}I とトリチウムの放射活性の分布を示している。 ^{125}I -小球体は、先に示したものと同様1日後でも遊離

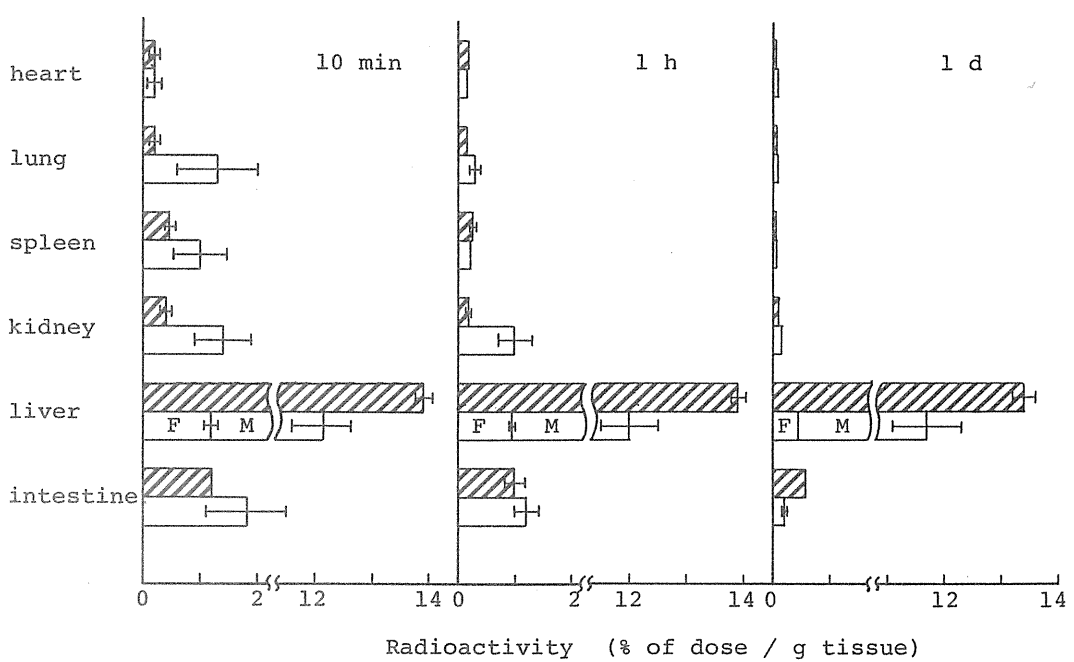


Fig. 34 Tissue Distributions of ^{125}I - and ^3H -Radioactivities at 10 min, 1 h, and 1 d after Intraportal Injection of ^{125}I -Microspheres or Non-labeled Microspheres Containing $^3\text{H}(\text{G})\text{-Adriamycin}$

▨ ; ^{125}I -microspheres

□ ; microspheres containing $^3\text{H}(\text{G})\text{-adriamycin}$

F and M ; free and microsphere fraction

Each column represents the mean \pm S.E. of 4-5 rats.

の放射活性がみられないところから、小球体中の ^{125}I —放射活性は小球体に強く結合していると考えられる。従ってこの小球体は分解されない限り ^{125}I —放射活性を遊離することはないと思われる。この理由から図中の ^{125}I —放射活性の分布は小球体自体の分布を示している。一方トリチウムの分布は先ほども述べた様に、その代謝物がほとんど知られていないということから、図中のトリチウムレベルは小球体中につつま込まれたADMと小球体から放出されたADMの分布を示していることになる。これらの割合を仮に小球体フラクション(M)、及び遊離フラクション(F)と名づけ、この実験の標的部位である肝臓に関してこの比率を求めた。

^{125}I —小球体の門脈内投与後、10分、1時間及び1日後に、肝臓1gあたりの投与量に対する薬物量(% of dose / gram liver)はそれぞれ13.9、13.9及び13.4であった。一方他組織中及び血中の ^{125}I —放射活性はわずかであった。更に ^3H (G)—ADMを含有した小球体の門脈内投与後、トリチウムの放射活性は主に肝臓に分布した。しかし肝臓中の薬物全量(% of dose in the liver)は ^{125}I —小球体の注射後の値より低かった。これは ^{125}I —放射活性が小球体に強く結合していることと、肝臓中や血液中で ^3H (G)—ADMが小球体から遊離している結果であると考えられる。肝臓中で遊離したADMは遊離薬物の門脈内投与後とはほぼ同じ様な挙動で各臓器に分布してゆくと考えられる。このため肝臓以外の臓器中のトリチウムレベルが ^{125}I —レベルより高くなると思われる。

^3H (G)—ADMを含有した小球体を注射後、10分、1時間及び1日後に、小球体から遊離したADMのトリチウムレベルはそれぞれ、1.21、0.90及び0.27 %/g liverであり、全トリチウム量に対する割合はそれぞれ1/10、1/13及び1/32であった。

遊離 ^3H (G)—ADM、 ^3H (G)—ADM含有小球体または ^{125}I —小球体を門脈内投与後10分、1時間及び1日後の肝臓中全放射エネルギーをFig. 35に示した。図には ^3H (G)—ADMまたは ^{125}I —小球体を静脈内投与後の分布についても記した。遊離薬物を静脈内または門脈内に投与すると、肝臓中のADMはほぼ1日で消失する。一方小球体の門脈内投与後では ^3H または ^{125}I の放射活性レベルは1日後でも非常に高かった。 ^{125}I —小球体を静注後10分では肝臓中に投与量の85.3%が取り込まれており、1日後においてさえ79.7%が肝臓中に残存していた。一方、 ^{125}I —小球体を門脈内投与した後の肝臓中の放射活性レベルは更に高く、ほぼ100%近くにも達する。この結果は肝臓における小球体の初回通過量の差によって説明される。また、静注後と異なり肺中小球体はほとんどみられず、小球体や含有薬物が特に肺に対して副作用を有する場合は、門脈内投与の方が安全であるといえる。また消化器癌細胞が消化器管腔に遊離したとすれば、遊離細胞は門脈

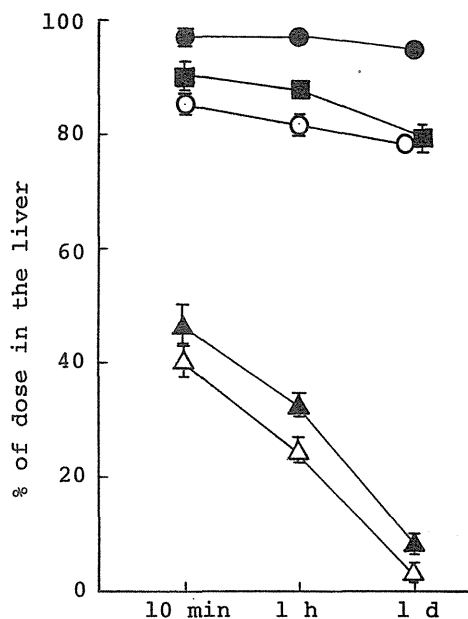


Fig. 35 Tissue Distribution of ^{125}I - and ^3H -Radioactivities in the Liver after Injection of Microspheres or Adriamycin

○; ^{125}I -microspheres after intravenous injection
●; ^{125}I -microspheres after intraportal injection
■; microspheres containing $^3\text{H(G)}$ -adriamycin after intraportal injection
△; free $^3\text{H(G)}$ -adriamycin after intravenous injection
▲; free $^3\text{H(G)}$ -adriamycin after intraportal injection

Each point represents the mean \pm S.E. of 4-7 rats.

系を通過して肝臓に転移してくるはずで、同時に小球体を投与する場合は、肝動脈から肝臓に入る一般的な静脈内注射より、癌細胞の転移通路である門脈から直接投与した方が、癌細胞と小球体が体内の同じ部位に分布する可能性も高く、効果もはるかに高いと考えられる。

第2項 adriamycin 含有小球体による抗腫瘍効果

ADM含有小球体をラットの門脈に投与すると、そのほとんどが肝臓中に取り込まれていることが明らかになったので、次にAH7974転移肝癌に対するこの小球体の抗腫瘍効果を延命率の増加と、組織切片標本から検討を加えた。

Fig. 36及びTable VIIはAH7974転移肝癌に未処理、遊離ADM処理、薬物を含有しない小球体処理及びADM含有小球体処理を施したラットの延命率を示している。10⁶個のAH7974細胞をラット門脈内に接種すると、癌細胞の肝転移を引きおこし、接種後10～16日（平均13.0日）に死亡する（Fig. 36, コントロール）。また遊離ADMや薬物を含有しない小球体の投与では、コントロールの延命率と有意な差はなかった。一方、ADM含有小球体の処理では、10匹中2匹に60日生存ラット（治癒とみなす）がみられ、残り8匹の平均生存日数でも19.5日となり、T/C%で示すと150%となった。

この結果、ADM含有小球体は、他の投与剤型に比べ著しく高い抗腫瘍効果を有していると考えられる。また薬物を含有しない小球体処理でT/C%が115であるところから、腫瘍細胞と小球体に物理的相互作用の存在が考えられ、抗腫瘍効果の発現に寄与していることも考えられる。

Fig. 37はラット肝臓の病理切片写真（ヘマトキシリン・エオシン重染色）を示している。Aは正常肝、BはAH7974細胞のみを門脈内接種後3日目の肝臓、Cは癌細胞と小球体を同時門脈内注入後同じく3日目の肝臓、Dは同10日目における肝臓を示している。AH7974細胞のみの処理では（B図）主にグリソン鞘（小葉間結合組織）に癌細胞の浸潤がみられる。一方小球体の処理では（C図）、小球体の塞栓効果による肝細胞の変性が観察されるものの、グリソン鞘中の癌細胞はまばらで浸潤増殖が顕著には認められない。D図は肝臓組織中の小球体の存在を示している。小球体は門脈から小葉間静脈、洞様毛細血管を経て肝細胞の間に現われたものと考えられ、このような組織中小球体の観察はMimranらの報告⁶⁷⁾にもみられる。

これらの組織切片観察から、(i)門脈転移肝癌は主にグリソン鞘を中心に浸潤増殖すること。(ii)ADM含有小球体処理によって、小球体は肝細胞間に現われ、(iii)塞栓効果と制癌剤ADMの持続的放出によって少量の正常肝細胞の変性をきたすものの、腫瘍細胞の増殖が著しく遅延することが明白になった。

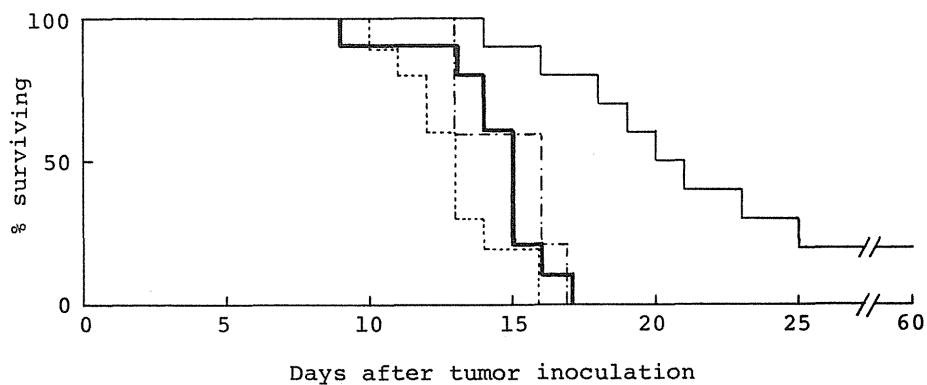


Fig. 36 Effect of Intraportally Administered Adriamycin or Microspheres on AH 7974 Liver Metastasis in Rats
; control, —; free adriamycin
 ----; microspheres without drug
 — — —; microspheres containing adriamycin

Table VII Effect of Intraportally Administered Adriamycin or Microspheres on AH 7974 Liver Metastasis in Rats

	survival days	T/C %	number of rats survived/treated
control	13.0 ± 0.6	-	0/10
free adriamycin	14.3 ± 0.7	110	0/10
microsphere containing adriamycin	19.5 ± 1.3 ^{*1} (27.6 ± 5.5) ^{*2}	150 ^{*1} (211) ^{*2}	2/10
non-entrapped microsphere	15.0 ± 0.8	115	0/5

*1 calculated with 8 rats not survived for 60 days

*2 calculated with 10 rats

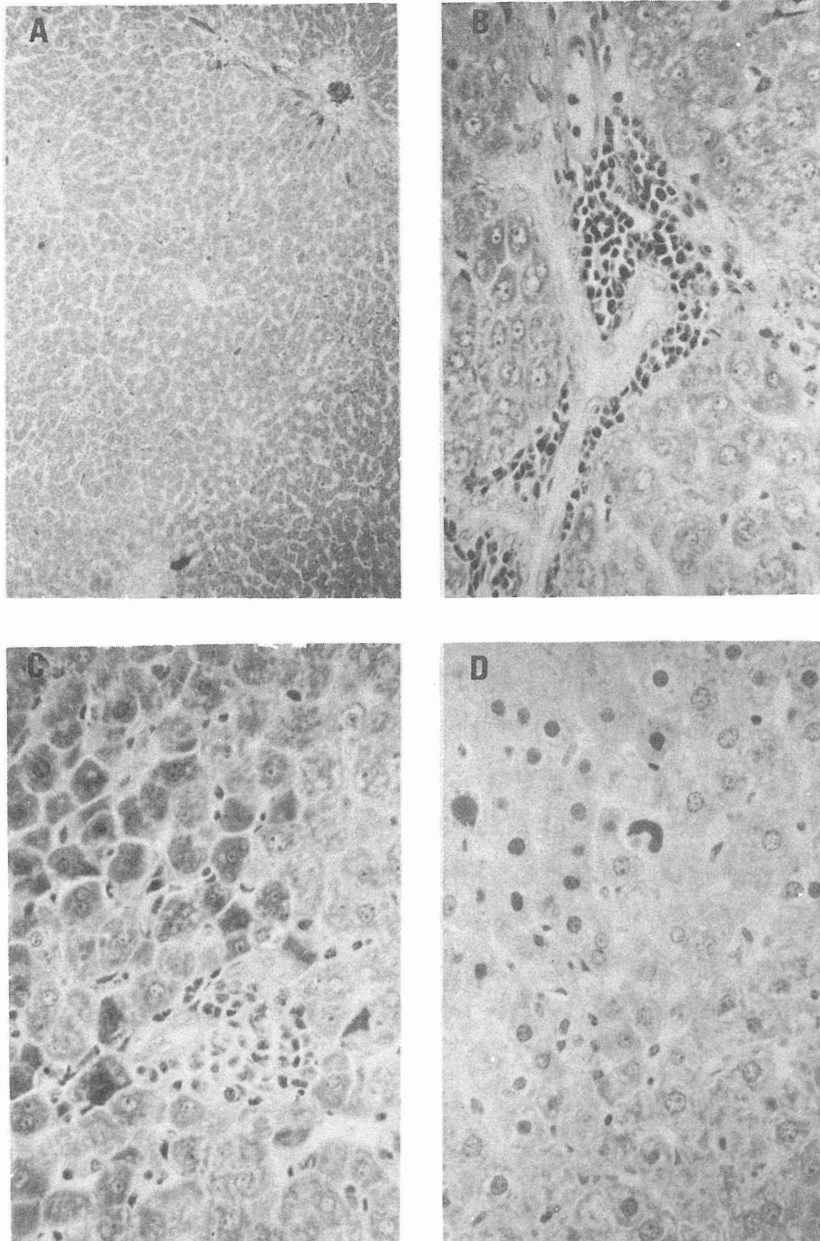


Fig. 37 Microphotographs of the normal and AH 7974 Metastasized Liver
 normal liver (A), tumor liver at Day 3 after inoculation of AH 7974 cells only (B), tumor liver at Day 3 (C) or 10 (D) after injection of AH 7974 and microspheres. Arrows indicate microspheres. (A; x40, B,C,D; x100)

第4節 小括と考察

消化器癌は門脈から転移し、肝臓癌を併発し、ついには全身に転移してゆくことがある。そのため現在では転移する前に手術でとりさる方法が最良とされているが、またその手術時に肝転移をきたす可能性のあることも事実である。今回モデル腫瘍として選択したAH 7974 門脈転移癌は、ほとんど肝臓のみに転移し、組織学的検討の結果、肝臓中のグリソン鞘に浸潤することがわかった。

アルブミン小球体を門脈から投与すると、癌細胞とほぼ同様なルートを経由して肝臓中に取り込まれる。小球体自体と含有薬物の体内分布の結果から、これらはほとんど肝臓のみに集中することが明らかであるので、他組織への副作用はほとんどないと考えられる。

更にこの実験において、ラット一匹あたりに接種したAH 7974 細胞数は 10^6 個であり、一方投与した小球体 2 mg の中には、約 2×10^8 個の粒子を含有するので、腫瘍細胞に近在している小球体は、この細胞に “phagocyte” されるかもしれないし、もし “phagocyte” されなくても、癌細胞近傍に ADM を放出してゆくと考えられる。更に小球体は含有薬物である ADM の徐放性を示すので（第1章、Fig. 9）、腫瘍中には ADM の治療レベルが維持されていることが期待される。

アルブミン小球体のような薬物担体は、その投与部位、並びに投与条件をその病態にあった条件に適合させれば、臨床上の有用性が強く期待される。本章で述べた結果はそのよい例で、制癌剤を含有したアルブミン小球体が消化器癌手術時の併用化学療法として十分効果を発揮するものと考えられる。

第 5 章

磁性アルブミン小球体による臓器選択性の増強⁶⁸⁾

第 1 節 緒 言

癌の化学療法では薬物を標的部位に正確に運ぶことが重要なカギとなっている。これまで述べて来たように、アルブミン小球体はその調製法を修飾することによって、脈管内投与で肝臓もしくは肺に薬物を局在化させることが出来、また投与方法や投与部位を考慮することによって目的とした部位に小球体を滞留させることが可能となる。これらの性質を応用して、これまで小球体の持続的抗腫瘍効果について述べて来たが、薬物の臓器選択性という点から、他の各組織や臓器にも特異的であることが望まれる。

そこで著者は、磁気に感應するアルブミン小球体を動物の標的部位に作成した磁場によって局在化させることを考えた。Fig. 38はこの考え方を模式図に示したもので、Weinsteinらの報告⁶⁹⁾の図を参考にした。図から明らかな様に、腫瘍部位等の病巣部位に磁場を作成し、磁気応答性を有する制癌剤含有磁性小球体を脈管内に投与すると、標的部位に磁性小球体が高濃度に局在し、その部位で薬物放出が起こることから、結果として、局在部位の近傍、すなわち標的部位（腫瘍部位）の薬物濃度が高まることになると想定される。

すでに加藤ら⁷⁰⁾は鉄フェライトと制癌剤であるマイトマイシンCを含有した磁性マイクロカプセルを調製し、家兎膀胱内の局部に多量の薬物担体を集中させることに成功している。更にWidderら⁷¹⁾はアルブミン小球体に鉄フェライトを含有させた磁気に感應する磁性アルブミン小球体を調製し、ラットの尾のあるセグメントに磁石を適用し、小球体を尾動脈内投与して、投与した小球体の37～65%もの量を磁石部位に局在化させたことを報告している。著者はこの磁性アルブミン小球体の有用性を更に実用的な系で明らかにするため、実験動物（マウス、ラット）の肺や腎臓を標的部位として、磁性アルブミンに含有させた制癌剤の体内分布を磁場によってコントロールすることを試みた。

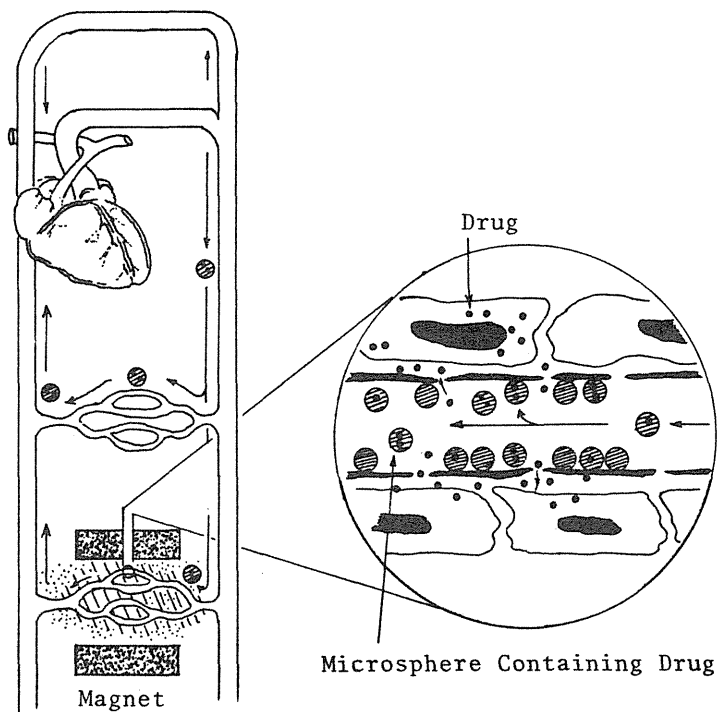


Fig. 38 Schematic Representation of the Possible Mechanism for Drug Delivery to Target Tissues by Magnetic Albumin Microsphere after Intravascular Administration

また更にAH 7974 腹水肝癌細胞を用いて転移肺癌を作成し、この実験腫瘍に対する遊離及び磁性小球体に含有されたADMの抗腫瘍効果を測定して、この磁性アルブミン小球体の薬物担体としての有用性についても研究した。

第 2 節 実験材料及び方法

実験材料：牛血清アルブミン（BSA）、5-FU、ADM、 ^{125}I -ヒト血清アルブミン（ ^{125}I -HSA、 ^3H -5-FU及び ^3H (G)-ADMに関しては今までと同様。磁性流体は Chart 5 の様に調製し、⁶⁸⁾ 一部はタイホー工業製（フェリコロイド、W-35）を用いた。磁気誘導に用いた磁石は永久磁石と電磁石で、永久磁石は Super Disc Magnet（Edmund Scientific, No. 30730, サマリウムコバルト製, 内径 5 mm, 外径 9.5 mm, 厚み 6 mm）

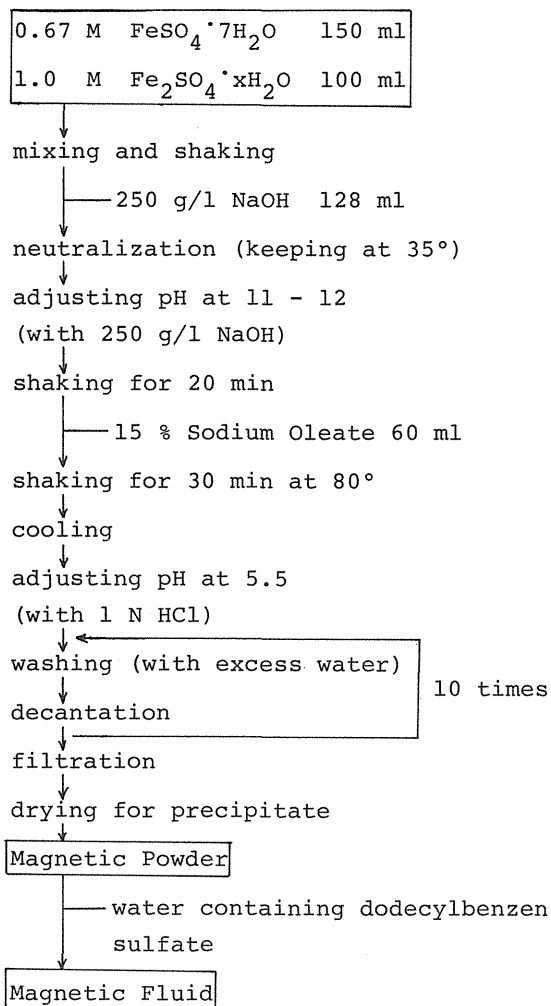


Chart 5 Schematic Diagram of Preparation
of Magnetic Fluid

で約 3000 G (ガウス) の磁力を有する。電磁石は日本電磁測器製で、ポール径 25 mm, ギャップ可変方式 (0 ~ 5 cm), 60 V, 10 A で 6000 G の出力を有する。実験中磁場の強さをチェックするため使用したガウスメーターは横河電機製 (タイプ 3251) を用いた。なお電磁石は連続使用では熱を発するので水冷式にしたが、約 30 分以上の連続可動は不可能であった。

磁性小球体調製法：磁性小球体の調製法は磁気に感応しない小球体の調製法とほぼ同様である。相違点を中心に述べる。まず、牛血清アルブミン (BSA) - 薬物 - マグネタ

イト混液を調製する。5-FUの場合は、BSA 150 mgと5-FU 250 mgを1.4 M トリスアミノメタン 0.5 mlに加え、それに磁性流体 0.5 mlを加える。ADMの場合はBSA 200 mgとADM 100 mgをそれぞれ別々に精製水 2 mlに溶解。両液を混和した後磁性流体を 0.5 ml加える。次にこの混液を10% (V/V) Span 85綿実油 100 mlに加え、Ultra-Turrax[®] (IKA, WERK)で8,000 または 20,000 rpm、30分水冷下で攪拌しマイクロエマルジョンとする。その後5-FUの場合は180℃、ADMの場合は120℃でこのエマルジョンを加熱固化した。³⁵⁾

磁性小球体の物理化学的分析法：磁性小球体の走査型電顕観察は、小球体を水に懸濁させ、乾燥、蒸着し、走査型電子顕微鏡（日立，モデルS-430）、またはX線マイクロアナライザー付き走査型電子顕微鏡（日立，モデルEmax 8,000）を使用して観察した。

磁性流体の透過型電顕観察は、同様処理を施した後、透過型電子顕微鏡（日立，H-600）を使用して行った。

磁性小球体の鉄含有量は、小球体を2N-NaOHに溶解し、ついで濃塩酸を適量加えて鉄を溶かし、水で希釈してから原子吸光光度計（日本 JARREL-Ash Co., タイプ AA 8200）で測定した。なお、この際鉄原子の吸収波長は3720 Åを使用した。

磁性小球体の磁気誘導に関する定性的検討は、一定量の小球体懸濁液をシャーレに入れ、約3000 Gのディスク状永久磁石を使用して行った。

磁性小球体からの薬物放出速度測定法：薬物を含有した磁性小球体50 mgを等張リン酸緩衝液（pH 7.4）50 mlに懸濁し、1分間超音波処理後遠心。上清を捨て、沈殿を等張リン酸緩衝液50 mlに再懸濁し、それを二重ビーカに入れガラススターラーを用い400 rpmで攪拌した。また懸濁液は実験中37℃に保った。

各サンプリング時間において、磁性小球体50 mlを全て遠心管に移して遠心し、上清を採取し薬物濃度を測定する。沈殿は再び等張リン酸緩衝液に懸濁し、上記と同様の操作で実験を続けた。

なお、蛋白分解酵素存在下での磁性小球体懸濁液からの薬物放出は、蛋白分解酵素であるプロナーゼ（科研化学）の10%溶液 1 mlを等張リン酸緩衝液で全量50 mlとし、それに磁性小球体50 mgを懸濁させた。

薬物（5-FU、ADM）の定量法は第1章と同様である。

磁性小球体のマウス肺またはラット腎臓への磁気誘導法：マウス肺への磁気誘導は以下の様に行った。ICR系雄性マウス（約30 g）を無麻酔下で背位固定し、背中と胸に約3,000 Gのディスク状永久磁石を各1ヶ適用した。ついで¹²⁵I-標識した磁性小球体、または³H-5-FU含有磁性小球体10 mgを0.2% (V/V) polysorbate 80 生理食塩水 2 ml

に懸濁し、その懸濁液 $1\text{ mg}/0.2\text{ ml}$ をマウス尾静内に投与し、投与後10、あるいは60分で断首脱血し、各臓器（腎臓、脾臓、肝臓、肺）中の放射活性を測定した。

ラット腎臓への磁気誘導は次の様である。Wistar 系雄性ラット（約 220 g ）をペントバルビタールナトリウム（ 60 mg/kg i. p. ）で麻酔し、正中線にそって開腹し、左腎動脈にヘパリン処理したポリエチレンチューブ（Clay Adams, PE 10）でバイパスを作成した。次に左腎臓の両側にディスク状永久磁石をはさみ込むように設置し、バイパス部から皮下用 30ゲージの注射針を用いて、 ^{125}I —磁性小球体または ^3H —5—FU含有磁性小球体（ $1\text{ mg}/0.2\text{ ml}$ ）を1分間にわたり投与した。投与後、10あるいは60分で断首脱血し、各臓器を取り出し放射活性を測定した。

AH 7974転移（移植）肺癌ラットの作成法： 実験動物は雄性 Donryu ラット、体重 150 g 前後のものを用いた。転移肺癌は無麻酔ラットの尾静脈からAH 7974 細胞 3×10^7 個注射して作成した。

電磁石によるラット肺への磁性小球体の磁気誘導法： Donryu ラットをペントバルビタールナトリウムで麻酔し、電磁石（ギャップ 2 cm ）の間に、ラットの肺がくるように固定した。次に磁性小球体 50 mg を 0.2% polysorbate 80生理食塩水 5 ml に懸濁し、その懸濁液 $5\text{ mg}/0.5\text{ ml}$ をラットの尾静脈内に投与した。なお、投与前に電磁石に 6000 G の磁場を発生させておき、投与後10分間適用した。

臓器中放射活性の測定： 放射性物質 ^3H と ^{125}I の定量は、すでに述べた様に液体シンチレーションカウンターとオートガンマカウンターを用いた。また $^3\text{H}/^{125}\text{I}$ 2重標識した生体試料は、 ^{125}I の半減期（60日）経過後再度測定して、それぞれの放射活性を見積った。

肺癌ラットに対する磁性小球体の効果の検討： AH 7974 転移肺癌ラット に関して、次の3通りの処理を施した。磁性小球体群として、接種後24時間後にペントバルビタールナトリウムで麻酔し、電磁石を適用、次に磁性小球体を一匹あたり $5\text{ mg}/0.5\text{ ml}$ （ADM $300\text{ }\mu\text{g}$ 含有）を尾静脈に投与した。同様な操作を接種後 8, 15日にも行った。ADM群として、接種後24時間後に無麻酔下ADM $300\text{ }\mu\text{g}$ 投与した。同様の操作を接種後 8, 15日にも行った。コントロール群として、接種した後、なんらの処理も行わなかった。

これら3群に対し、肺の組織学的標本、肺の重量変化並びにラットの延命率に関し検討を加え、効果を比較した。

肺の組織学的検討は、AH 7974 移植後、上記の様に遊離薬物、または磁性小球体処理を行い、5, 10日に肺を取り出し、ホルマリン固定後薄切、ヘマトキシリン・エオシン重染色を施した。なお比較のために健康ラットの未処理群と磁性小球体のみの処理群

を加えた。また、肺の重量はAH7974 転移ラットに磁性小球体を投与し、移植後 5 日おきにラットを断頭して殺して測定した。比較のためにAH7974 転移ラットの未処理群と、健康ラットを加えた。なお実験はラット 5 週令（約 150 g）から始めた。更に延命実験に関しては、先に示した投与スケジュール（磁性小球群、ADM群、コントロール群の 3 通り）にそって行い、T/C%によって効果を決定した。

第 3 節 実験結果

第 1 項 磁性小球体の調製と性質

磁性アルブミン小球体の調製には磁性流体を用いた。磁性流体は液体としての流動性と磁性体としての磁気特性を併せもつ新しい工業材料として注目をあびており、現在多方面に利用されつつある。⁷²⁾ マグネタイトコロイドの粒子径は $100 \sim 200 \text{ \AA}$ であり、四三酸化鉄粒子の表面にオレイン酸ナトリウムとドデシルベンゼンサルフェートが各一層ずつ単分子吸着している。⁷³⁾ 一方市販の四三酸化鉄粉末はせいぜい $1 \mu\text{m}$ 程度で、粉碎をくり返したとしても $0.1 \mu\text{m}$ のオーダにしかない。実際この大きさの粉末を使って小球体を作ってみたが、小球体に含有されずに残った粉末も多く、出来た小球体も大きくなってしまう（ $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 以上）。この欠点は磁性流体を使用することによって克服することが出来た。

以下こうして調製した磁性小球体の性質について列挙する。

(1) 形 状

磁性小球体の走査型電子顕微鏡写真（Fig. 39）から明らかなように、この小球体は球形で表面に小さなおうとつを有している。磁性流体中のマグネタイトの大きさはその透過型電子顕微鏡写真（Fig. 40）からも明らかな様に $100 \sim 200 \text{ \AA}$ であり、小球体表面のとつ部の大きさとほぼ一致することから、小球体表面に磁性粒子が配列しているものと思われる。

(2) 粒子径

小球体の大きさは、小球体の組成と攪拌条件、固化温度によって左右される。当教室で行った実験では、平均粒子径が $0.2 \sim 45 \mu\text{m}$ 程度まで作成が可能とされている。本実験において動物実験等に使用した粒子の平均径は約 $1 \mu\text{m}$ と約 $3 \mu\text{m}$ のものである。

(3) 組成・元素分析

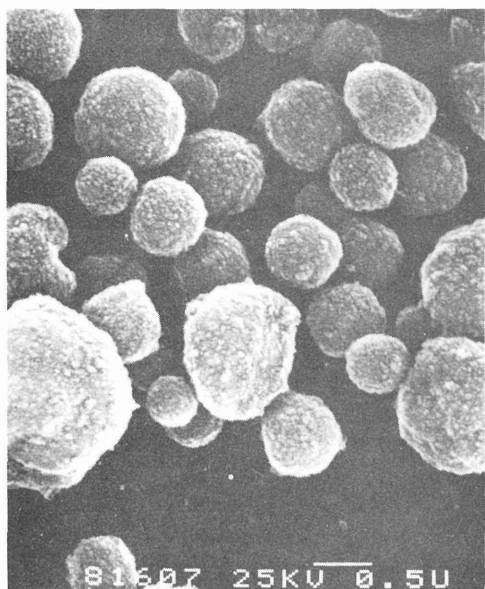


Fig. 39 Scanning Electron Micrograph of magnetic microspheres

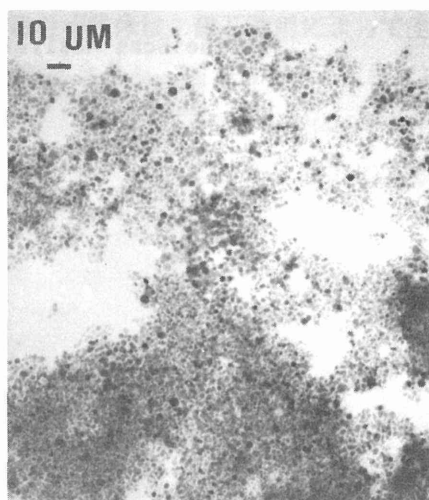


Fig. 40 Transmission Electron Micrograph of Magnetic Fluid

磁性小球体をX線マイクロアナライザーが装備された走査型電子顕微鏡で調べた。

Fig. 41 の上図、A及びB点で点分析 (Point Analysis) を行くと、それぞれ下図のようなスペクトログラムが得られた。鉄の特性X線エネルギーは6.798 (K_{α}) と7.057 (K_{β}) KeVにあり、小球体中 (B点) にのみ鉄元素の存在がみられ、小球体間のコントロールスポット (A点) には特殊な元素は検出されなかった。

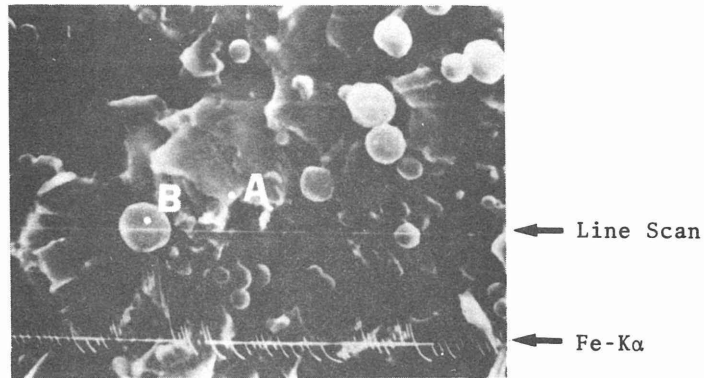
次に、上図の中央ラインに K_{α} のX線エネルギーを与えて線分析 (Line Analysis) を行った。波状のグラフは鉄濃度を示しているが、ちょうど小球体の位置にピークがみられ、その他のライン上においてピークがみられないことから、遊離の鉄が存在していないことも合わせて明らかとなった。

なお、小球体の磁性粒子の含有量は、小球体を溶かし原子吸光光度法で測定した結果、約50%であった。

(4) 磁性小球体の毒性

磁性アルブミン小球体の毒性は、アルブミン小球体自体の毒性とフェライトの毒性に分けて考えられる。アルブミン小球体の抗原性はまったくないとは考えられないが、第1章でも述べたように抗体産生能は非常に弱く、現在まですでに十年以上もスキャンニ

Line Scan Analysis



Point Analysis

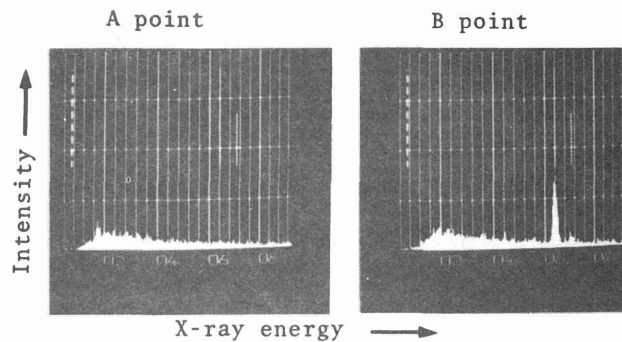


Fig. 41 Elemental Analysis of Magnetic Microsphere by an Energy Dispersive X-ray Spectrometer

グ剤として用いられているものの、重篤な副作用が報告されていない。またフェライトの毒性は亘理ら⁷⁴⁾や戸部ら⁷⁵⁾によって報告されている。彼らはマウスやラットにフェライト懸濁液を経口投与しても、ほとんど毒性が表われなかったことを報告している。ただ脈管内投与後は、その粒子径が大きいために、肺閉塞を始めとする血管閉塞が生じることも述べている。⁷⁴⁾ しかしながら著者が用いた磁性小球体中のフェライト粒子は100～200 Åであり、亘理らの実験に用いられたフェライトと比べ、約1/100程度の大きさと考えられるので、この閉塞作用は無視できる程少ないと思われる。

(5) 磁性小球体の磁気応答性

Fig. 42は磁性小球体の一定量を懸濁させ、それをシャーレに移しディスク状永久磁石(約3000 G)を適用後、それぞれ0, 5, 15, 及び60秒における連続写真である。

磁石適用前 (Fig. 42 の 0 秒) 均一に懸濁していた磁性小球体は、磁石適用によって生じた磁力により、すみやかに磁石に集まってゆくのが観察された。図から明らかな様に磁石適用後 60 秒では、大部分の磁性小球体が磁石周辺に集まり、その後の小球体の移動はほとんど見い出されなかった。このように磁性小球体は磁気によく感應し、磁力によって誘導されるという優れた磁気応答性を示すことが確認された。

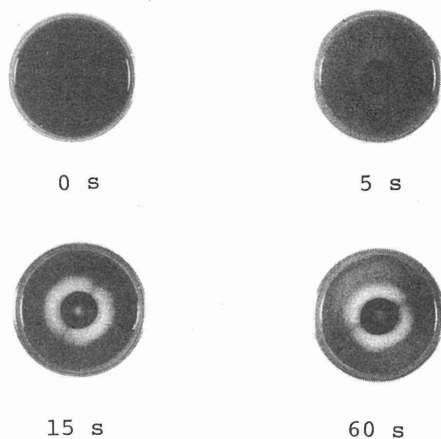
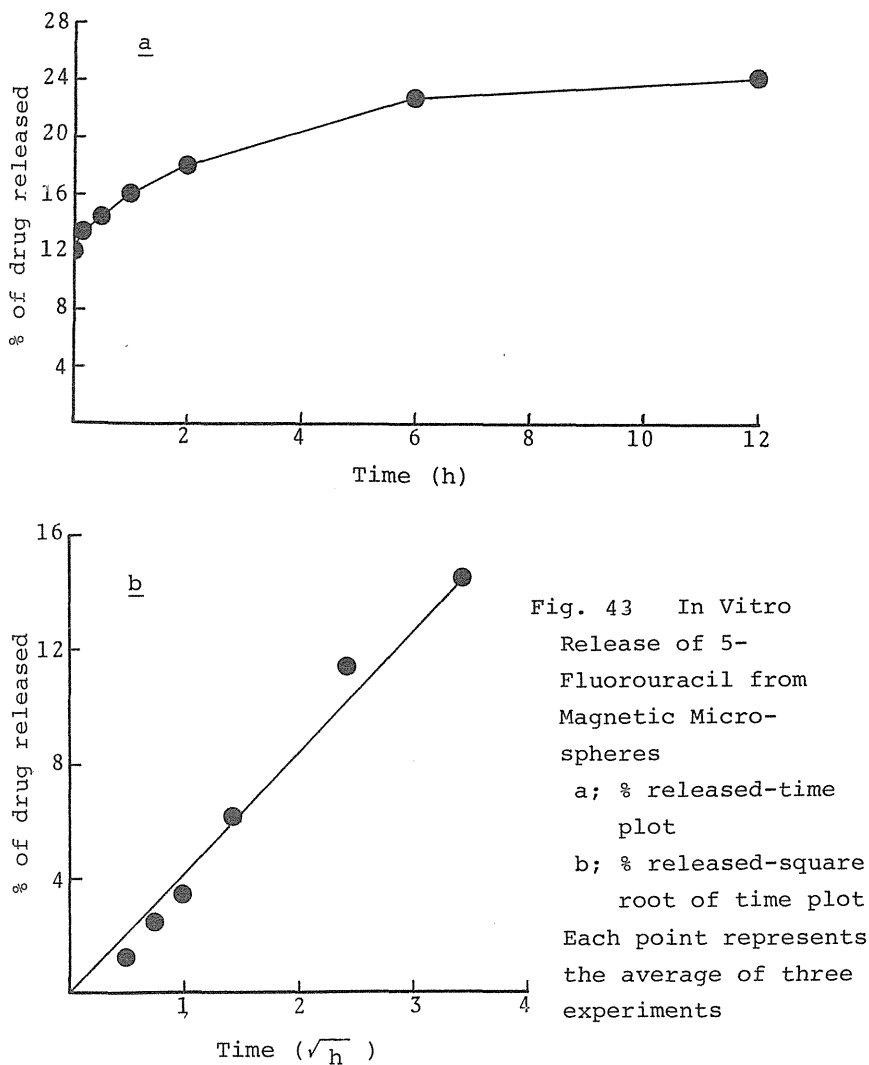


Fig. 42 Sequential Time Sequence Photographs of Magnetic Microspheres in Aqueous Suspension after a Disc Magnet is applied

(6) 磁性小球体からの薬物放出

5-FU と ADM を含有した磁性小球体の *in vitro* における放出挙動を検討した。

Fig. 43 a は磁性小球体からの 5-FU 放出量を時間に対してプロットしたものである。図から明らかな様に、まず初期に多量の薬物が放出され、以後非常にゆっくりとした速度で放出されるという二つの放出過程のあることが確認された。また、実験開始後 5 分までに約 10% 放出し、その量を差し引くと、すなわち b 図の様に、その後の放出は、ほぼ時間の平方根に比例することが観察された。



次に Fig. 44はADMの放出結果である。ADMの場合は5-FUと異なり、初期にはほとんど薬物が放出されず、2日目から徐々に放出され、1週間に渡って持続的に放出されることが観察された。

第1章で述べた様に磁気に感应しないアルブミン小球体は、標的組織内に取り込まれた後、細胞内のライソゾーム酵素により消化分解されることが予想される。そこでプロテアーゼ（蛋白分解酵素）存在下で、小球体からのADM放出量を測定した。Fig.45から、放出速度並びに放出量は酵素が存在しない場合と比較して、大幅に増加することが観察された。この結果から、小球体による薬物放出は単なる物理的放出と、細胞内に取り込まれた

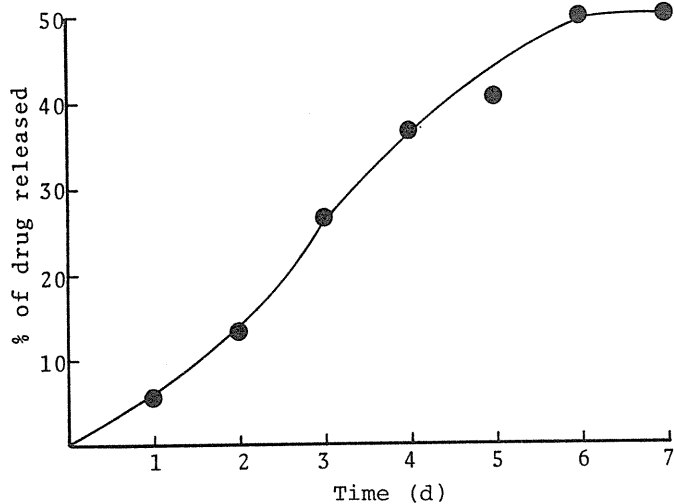


Fig. 44 In Vitro Release of Adriamycin from Magnetic Microspheres
Each point represents the average of three experiments.

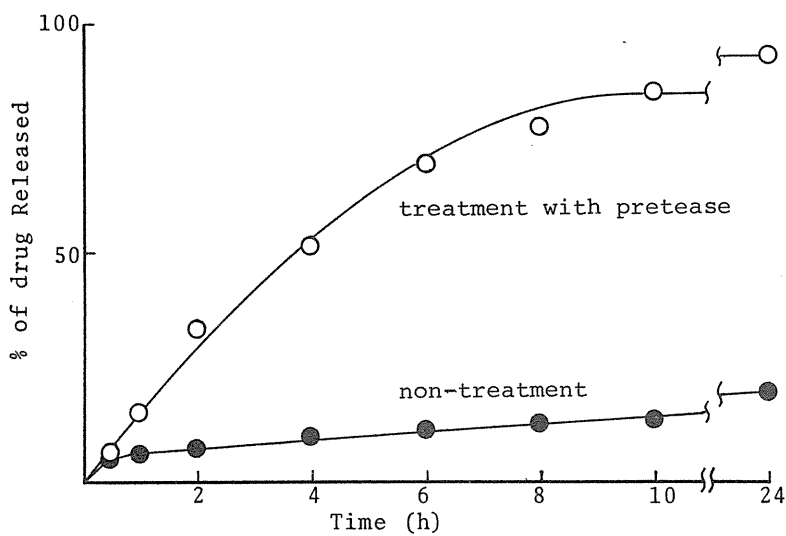


Fig. 45 Effect of Protease on the in Vitro Release of Adriamycin from Magnetic Microspheres
Each point represents the average of three experiments.

後、ライソゾーム酵素によって熱変性アルブミンが加水分解され薬物を溶出する2つの過程を考えることが出来る。

第2項 磁性小球体の体内分布に対する粒子径の影響⁷⁶⁾

肺に小球体を集めるためマウスを無麻酔下背位固定し、背中と胸にディスク状永久磁石（約 3000 G）を各 1 ケ適用し、¹²⁵I-ヒト血清アルブミンで標識した磁性小球体（180℃固化、平均粒子径 1 または 3 μm ）を尾静脈内投与した。

なお、磁性アルブミン小球体に含有された¹²⁵I は、ほとんど小球体から遊離しないので、¹²⁵I の放射活性は小球体自身の分布を示す。

Fig.46 は投与後10分における¹²⁵I-放射活性の臓器分布である。磁石を適用しなかったコントロール群では、平均粒子径 1 μm の磁性小球体を投与した時、肺への分布量は 15.8 %/g tissue (3.9 % of dose) であるが、磁石の適用によって 53.0 %/g

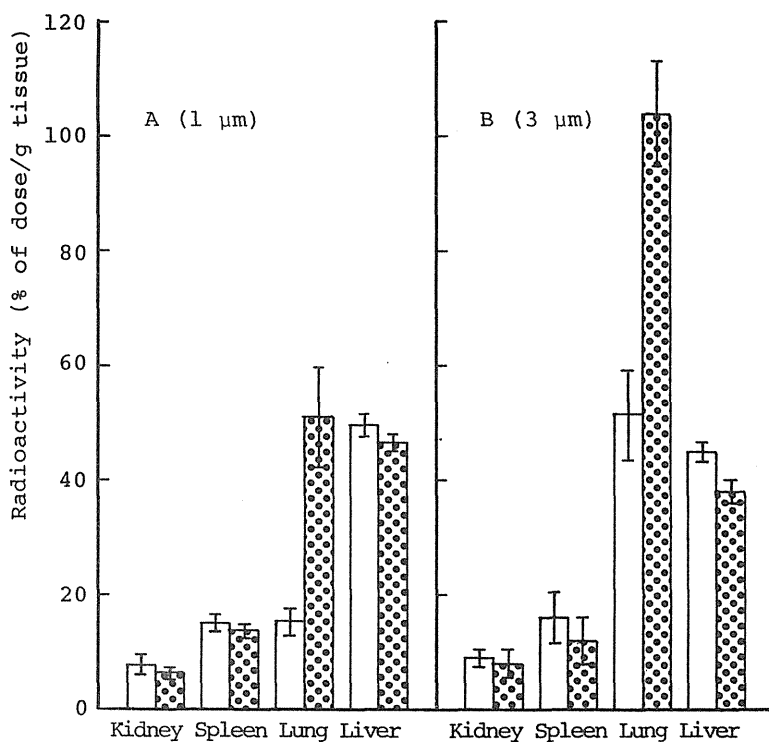


Fig. 46 Tissue Distribution of Radioactivity at 10 min after Intravenous Injection of Magnetic Microsphere (1 and 3 μm in diameter)
 □ ; control (no magnet), ▤ ; treatment with two magnets throughout the experiments.
 Each column represents the mean \pm S.E. of 3-5 mice.

tissue (12.5 % of dose) まで増加し、磁石の適用によって標的部位に磁性小球体を局在化させることが可能であることが判明した。

ついで平均粒子径 3 μm の磁性小球体を投与した時、コントロール群では、51.7 % / g tissue (10.7 % of dose) となり、粒子が大きくなったことに起因する分布量の増大が認められたが、磁石適用によって、更に 104.0 % / g tissue (21.6 % of dose) と増加し、ここでも肺での分布量に対する磁石適用の影響が明らかに観察された。

第 3 項 尾静脈内投与による肺への磁気誘導

磁石の適用によって標的臓器に局在化させた小球体が、磁石の適用後どのような消失挙動を示すか、また磁性小球体に含有された ^3H -5-FU の標的部位における分布パターンについて検討を加えた。

第 2 項と同様な操作で 3 μm の磁性小球体を用いて行い、投与後 60 分における小球体分布に関して以下の 3 項目、1) 磁石がない場合、2) 60 分間磁石を適用しつつつけた場合、3) 投与後 10 分間は磁石を適用し、あとの 50 分間は磁石を取り除いた場合に関して実験を行った。

Fig. 47 から明らかなように、60 分間磁石を適用した時、肺に分布した磁性小球体量は、113.0 % / g tissue (28.2 % of dose) であるが、10 分間適用しその後 50 分間磁場を除去した場合の分布量は 84.5 % / g tissue (21.3 % of dose) となって明らかに減少した。(Fig. 46 において示した様に磁石適用後の取り込み量は 104.0 % / g tissue で 60 分間適用後の取り込み量とほぼ同じであった。) この 50 分間に肺から消失した小球体は、60 分間磁石適用時の肝臓の取り込み量より 10 分間適用時の値の方が大きいことから、肝臓に取り込まれたものと思われる。

更に担体である磁性小球体の臓器分布だけでなく、 ^3H -5-FU を含有させた小球体を使用して、含有薬物の分布挙動を調べた。Fig. 48 は遊離 ^3H -5-FU と ^3H -5-FU 含有磁性小球体投与後、60 分における体内分布を示している。なお、 ^{125}I - 標識した磁性小球体の体内分布も同時に示した。この図から肺に磁石を適用して 5-FU 含有磁性小球体を投与した場合、遊離 5-FU の約 7 倍量が肺に集中したことが明らかになった。また磁性小球体に含有された ^3H -5-FU と ^{125}I の放射活性の臓器分布を比較した場合、肺では ^{125}I の放射活性の方が ^3H -5-FU のそれより高く、含有された 5-FU の全てが小球体と同じ挙動をとることはなく、時間の経過につれて、小球体から離れて、腎臓や肝臓に

分布することが推測された。

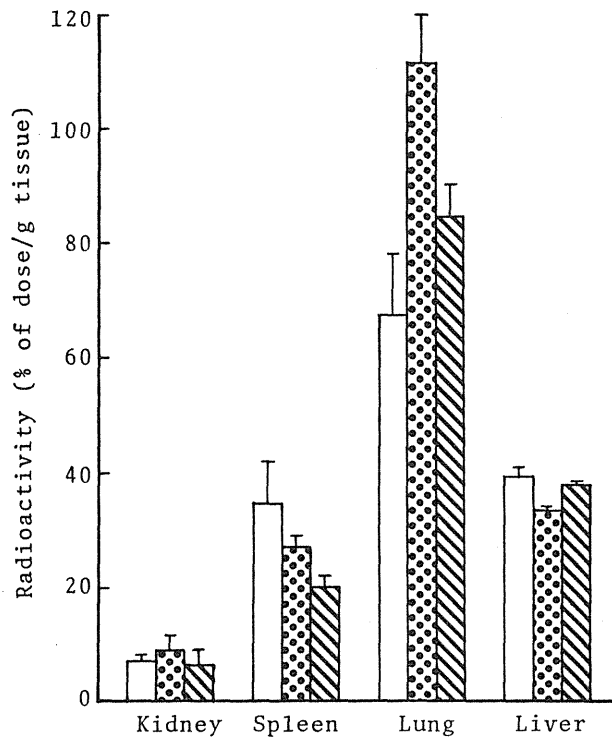


Fig. 47 Tissue Distribution at 60 min after Intravenous Injection of the 3- μ m Magnetic Microsphere in Mice

□; control
▤; magnet (60 min)
▨; magnet (10 min)

Each column represents the mean \pm S.E. of 3-5 mice.

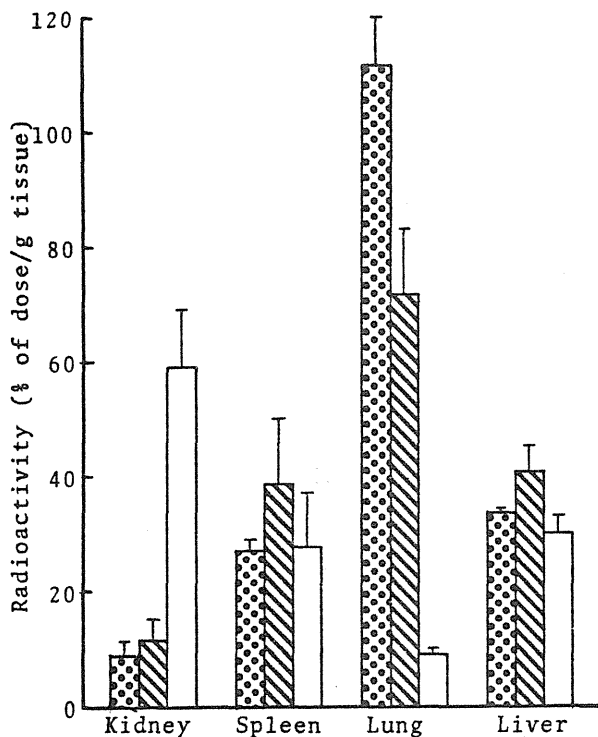





Fig. 48 Tissue Distribution of Radioactivity at 60 min after Intravenous Injection of ^{125}I -Microspheres, or Microsphere-entrapped or Free ^3H -5-Fluorouracil in Mice

 ; ^{125}I -microsphere
 ; ^3H -5-fluorouracil microsphere
 ; ^3H -5-fluorouracil

Each column represents the mean \pm S.E. of 3-5 mice.

第4項 腎動脈投与後の磁性小球体の磁気誘導⁷⁶⁾

前項においては、マウスの肺を標的部位とし小球体の局在化を検討したが、本項では更にラットの左の腎臓を標的部位として実験を行った。まず、ラットを麻酔下背位固定し、腹部を開き腎動脈にバイパスを作成して、そのバイパス部から小球体を投与した。その際、磁石は腎臓の両側にはさみ込むように設置した。本項で用いた小球体は $1\text{ }\mu\text{m}$ である。

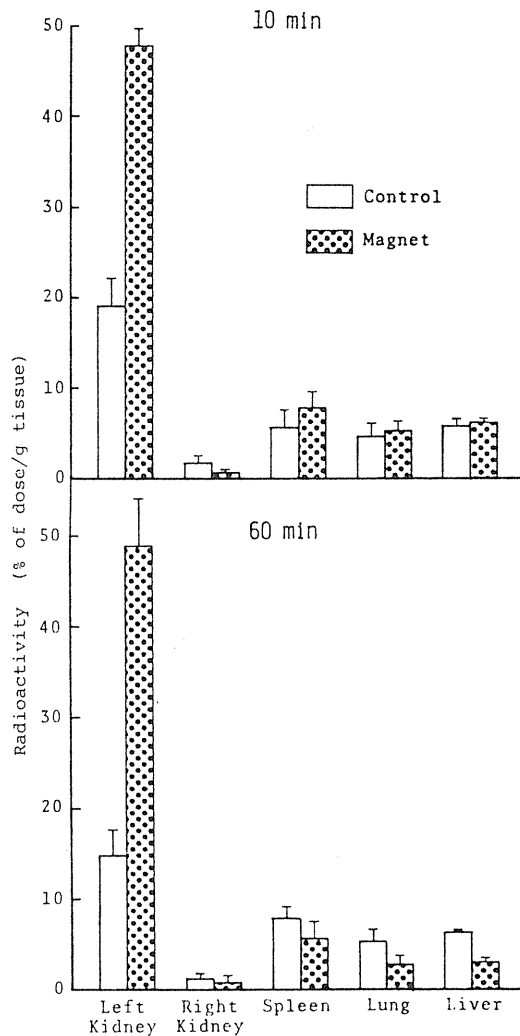


Fig. 49 Tissue Distribution of Radioactivity at 10 and 60 min after Intra-renal-arterial Administration of the 1- μ m Magnetic Microspheres in Rats
Each column represents the mean \pm S.E. of 3 rats.

Fig. 49は腎動脈投与後、10分と60分における臓器分布を示したものである。投与後10分での左の腎臓中の小球体量は、他の臓器（脾臓、肺、肝臓）の5～10倍高く、60分後でもこの高い値は変化なく、磁石の適用によって腎臓中に小球体を効率よく保持できることが示唆された。

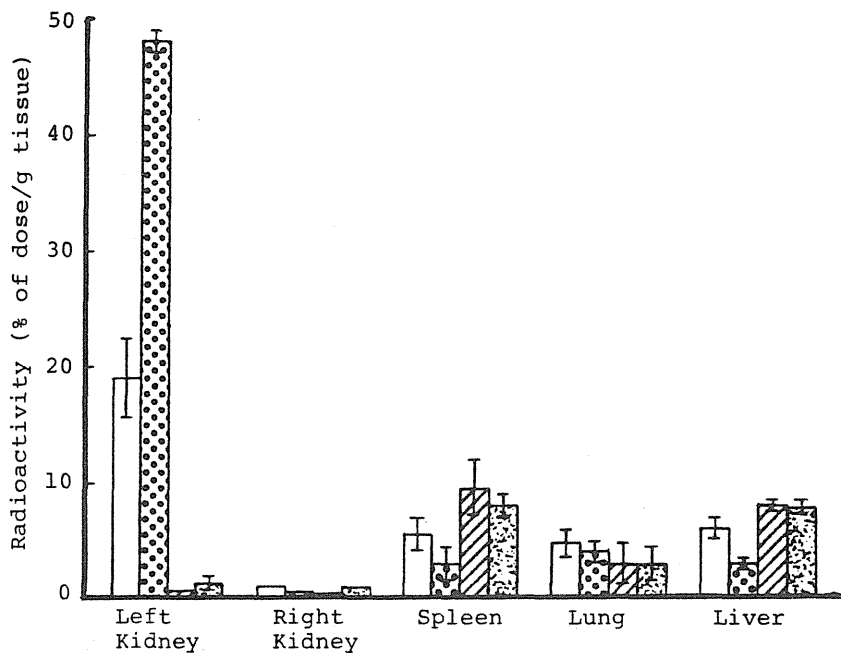


Fig. 50 Tissue Distribution of Radioactivity at 10 min after Intravenous or Intraarterial Administration of the 1- μ m Microsphere in Rats

□; intra-renal-artery (no magnet)
 ■; intra-renal-artery (with magnet)
 ▨; intratail vein (no magnet)
 ▩; intratail vein (with magnet)

Each column represents the mean \pm S.E. of 3-5 rats.

Fig. 50 は標的部位である腎臓への小球体の局在化に対する投与経路の影響を示したものである。静脈内投与では、磁石を適用した時でも左の腎臓には集中せず、主に細網内皮系の発達している肝臓と脾臓に分布した。

これは静脈内投与によって小球体が心臓を経由して全身に分布し、肝臓や脾臓に取り込まれたため、腎臓へ到達する小球体量が動脈内投与時より著しく減少してしまうことに起因すると考えられる。このように、磁気誘導によって小球体を標的部位に局在化させようとする時、他の組織や臓器における初回通過時の取り込み現象の影響を可能な限り少なくすることが必要であり、投与部位の決定においては、そのことを十分考慮しなければならない。

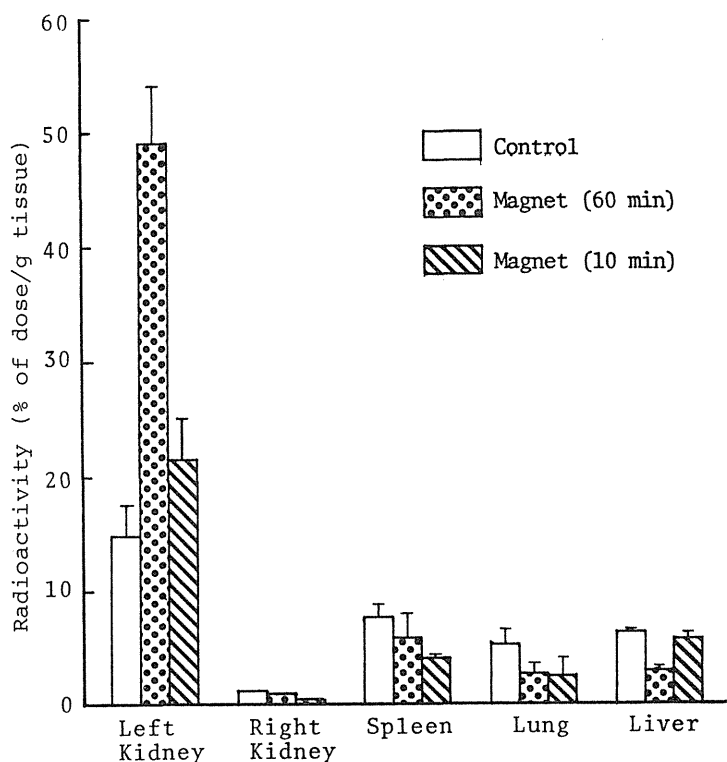


Fig. 51 Tissue Distribution of Radioactivity at 60 min after Intra-renal-arterial Administration of 1- μ m Magnetic Microsphere in Rats

Each column represents the mean \pm S.E. of 3-5 rats.

標的部位に局在化させた小球体が、磁石の除去後どの様な消失を示すかという問題は、組織への小球体の取り込み様式を知るうえで興味深い。

そこで腎動脈内投与後60分における小球体分布に関して、以下の3項目、1) 磁石がない場合、2) 60分間磁石を適用し続けた場合、及び3) 投与後10分間磁石を適用し、その後50分間は磁石を取り去った場合に関して実験を行い、Fig.51に結果を示した。

磁石部位、すなわちラットの左の腎臓において、磁石を60分間適用した場合分布量が一番高く、10分間の磁石適用では、かなり値が下った。これは、磁石を取り除いてからの50分間に、この標的部位から小球体が遊離したためと思われる。更に、その遊離した小球体はほとんど肝臓に分布することが、この図から明らかとなった。

次に Fig. 52は ^3H -5-FUを含有した小球体を使用して薬物の分布挙動を調べたもの

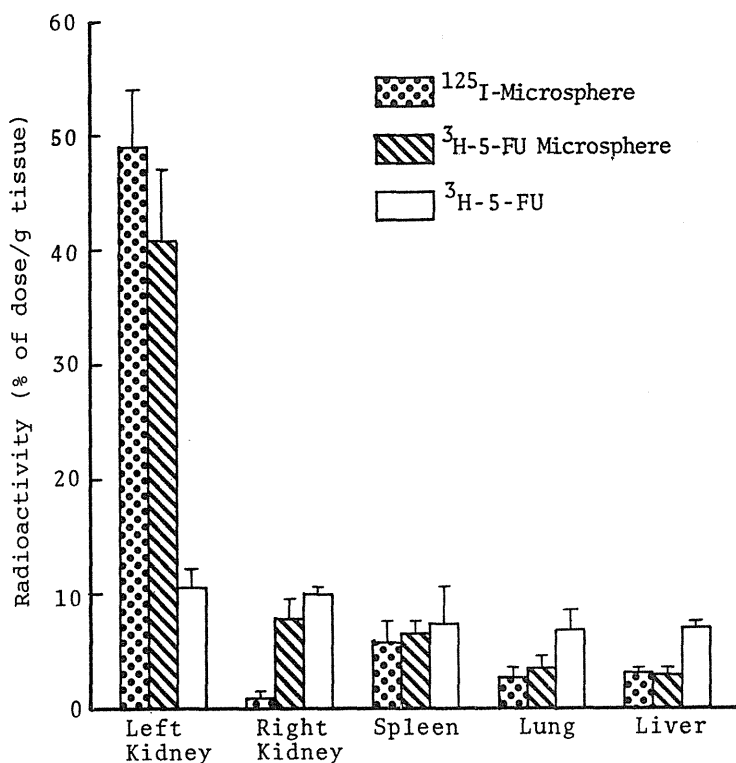


Fig. 52 Tissue Distribution of Radioactivity at 60 min after Intra-renal-arterial Administration of ^{125}I -Microspheres, or Microsphere-entrapped or Free ^3H -5-Fluorouracil in Rats

Each column represents the mean \pm S.E. of 3-5 rats.

である。

遊離 ^3H -5-FU の腎動脈内投与後60分では、各臓器にほぼ等しい濃度で分布したのに対して、磁性小球体に含有した ^3H -5-FU の腎動脈内投与では、腎臓に遊離 ^3H -5-FU の約4倍量の放射活性が存在した。

以上の結果から磁性アルブミン小球体は、磁気誘導によって標的部位へ薬物を運搬できる優れた Site specificity を有する新しいタイプの薬物担体であることが示唆された。

第5項 AH 7974 移植肺癌の作成とその形態

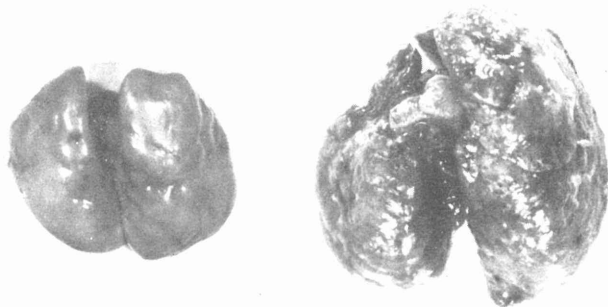
磁性アルブミン小球体は優れた磁気応答性及び薬物保持能を有することが *in vitro* において確認され、更に生体内でもこの薬物担体を磁気誘導できることが認められた。そこで薬物含有磁性小球体の癌化学療法における応用を目的として、AH 7974 肺癌に対する抗腫瘍効果について検討した。

なお、以後の実験結果に関しては適用磁石をこれまでより増強するため、ディスク状永久磁石にかえて、最大出力約 6000 G の電磁石を用いた。また小球体の大きさは平均直径約 3 μm のものを用い、含有薬物には ADM を選んだ。

AH 7974 移植肺癌は、150 g 前後の雄性 Donryu ラットに作成した。作成法は AH 7974 腹水癌の 3×10^7 個/0.3 ml を尾静脈から投与して行った。前章で述べた様に、この腹水癌は主に 2, 3 ケの細胞が集合した状態（いわゆる島を形成する）になっており、比較的細胞自体が堅いために、尾静脈投与するとほとんど肺のみに浸潤する⁶⁴⁾といわれており、他の臓器への転移現象はほとんどみられない。

佐藤ら⁷⁷⁾は、AH 7974 肺癌の移植率は悪く、 10^2 個投与で 0%、 10^4 個で 60%、 10^6 個で 80% の移植率であったことを報告している。AH 7974 腹水癌は普通 10^8 個/ml 程度の細胞を腹水中に有するため、著者は希釈せず 3×10^7 個を移植細胞数と決めた。この処理によって移植率は 100% となり、平均生存日数は 16.4 日であった。

Fig. 53 は正常ラットの肺と AH 7974 移植後 10 日目の摘出肺の実体写真である。AH 癌の移植によって肺全体は腫瘍塊となっており、Ehrlich 固型癌の進行過程でみられるような癌中心部の壊死による空洞は認められず、おおむね充実性である。肺における癌細胞の非常に高度な浸潤増殖により、肺容積が著しく増大していることが認められる。



Normal Lung AH 7974 Metastasized Lung
Fig. 53 Photographs of Normal and AH 7974 Metastasized
Lung at 10 Days after Inoculation

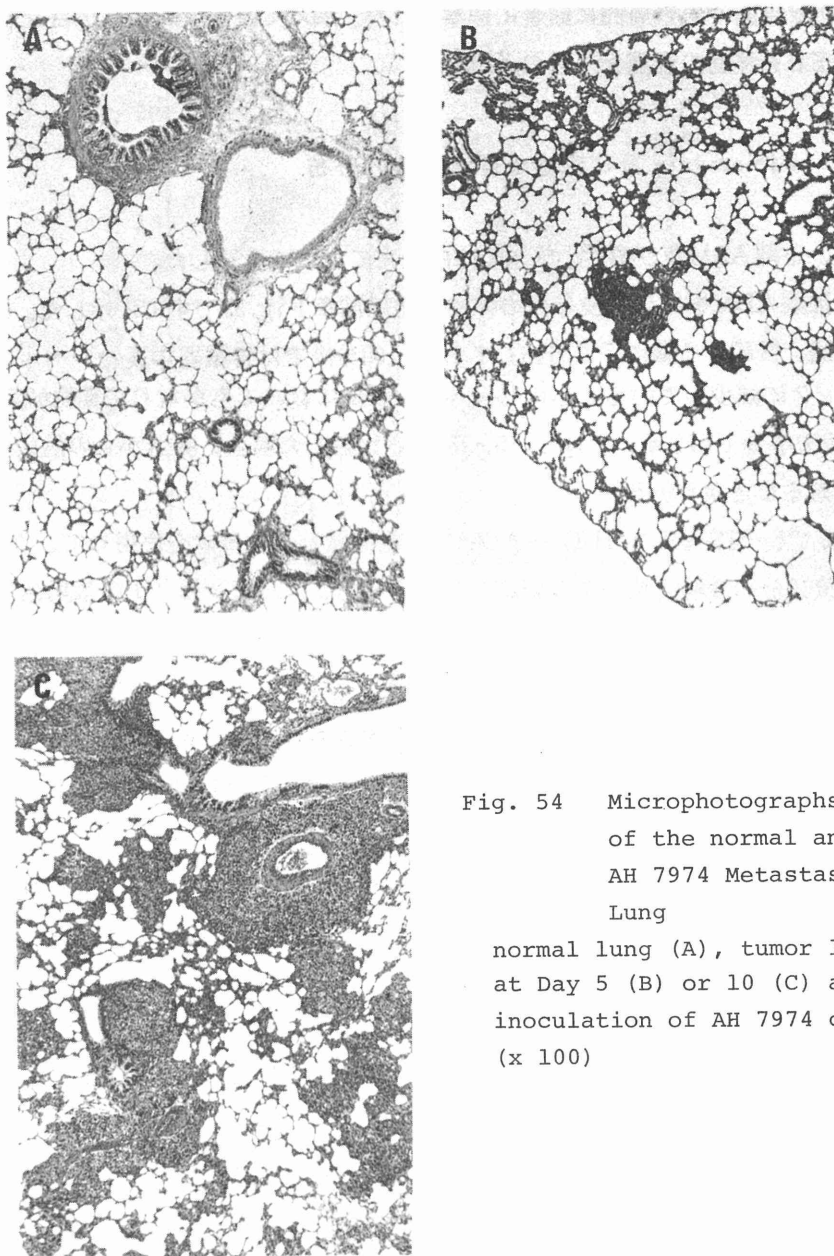


Fig. 54 Microphotographs
of the normal and
AH 7974 Metastasized
Lung

normal lung (A), tumor lung
at Day 5 (B) or 10 (C) after
inoculation of AH 7974 cells
(x 100)

Fig. 54はそれぞれ正常ラットとAH 7974を移植後5及び10日の肺の組織切片写真（ヘマトキシリン・エオシン重染色）を示している。正常ラットの肺（Fig. 54 A）に比べ腫瘍接種後5日後（同B）では、AH 7974細胞は定着しているものと考えられ、巣状に腫瘍が認められる。また、10日後（同C）では、AH 7974細胞は更に増殖しているものと

考えられ、血管周囲や気管周囲に顕著に観察された。加えて血管壁の肥厚が目立ち、一部では肋膜下でも腫瘍の浸潤がみられた。

第6項 adriamycin 及び磁性小球体の体内分布

本項では、遊離 ADM 及び磁性小球体の体内分布について検討した。

ラットに遊離 ADM を尾静脈投与後の体内分布は前章 Fig. 33 ですでに示した。投与後 10 分では腎臓、肝臓、心臓に多く分布しており、60 分後では各臓器中薬物レベルは、10 分後の約 $1/2$ に減少している。しかし投与後 1 日後においてもかなりの薬物が存在し、5-FU の消失挙動（第2章、Figs. 15, 16）と比較した場合、臓器からの消失挙動が遅い薬物であることがわかる。

Fig. 55 は ^{125}I -HSA 及び ^3H (G)-ADM で 2 重標識した小球体を使用して、ラットに静脈内投与後 10 分の放射活性分布を測定したものである。同図 a は ^{125}I の放射活性、すなわち小球体自体のレベルを、同 b は ^3H の放射活性、すなわち小球体中の ADM と小球体から遊離した ADM の和を示している。なお b 図には遊離 ^3H (G)-ADM 投与後の挙動も併記した。また、以下の実験で用いた小球体の大きさは約 $3\ \mu\text{m}$ である。

a 図から明らかな様に、コントロール群（磁石処理なし）の肺中小球体量は $11.5\%/\text{g tissue}$ であるのに対し、電磁石を適用すると 19.7% にも達し約 2 倍の増加をみた。一方肝臓、脾臓及び心臓中の小球体レベルも磁石処理によって減少し、磁性小球体と電磁石を組み合わせることにより、肺への選択的な小球体移行が促進されることが明らかになった。

b 図は含有薬物である ADM の挙動について検討したものであるが、これも電磁石処理によって肺への薬物レベルは増加し、コントロールの 1.6 倍、また遊離薬物に比べると約 8 倍もの高い値を示した。

これらの結果は、第2及び3項におけるマウス肺を標的部位とした実験とほぼ同様となり、小球体の粒子径の修飾により、ヒトなどの大動物へのアニマルスケールアップ⁷⁸⁾も可能であることが示唆された。

なお図には示さなかったが、AH7974 移植肺癌ラットに ^{125}I -磁性小球体を投与したところ、健康ラットとほぼ同様に肺への選択的な体内分布が得られたので、次項に磁性小球体に含有された ADM の抗腫瘍効果について述べる。

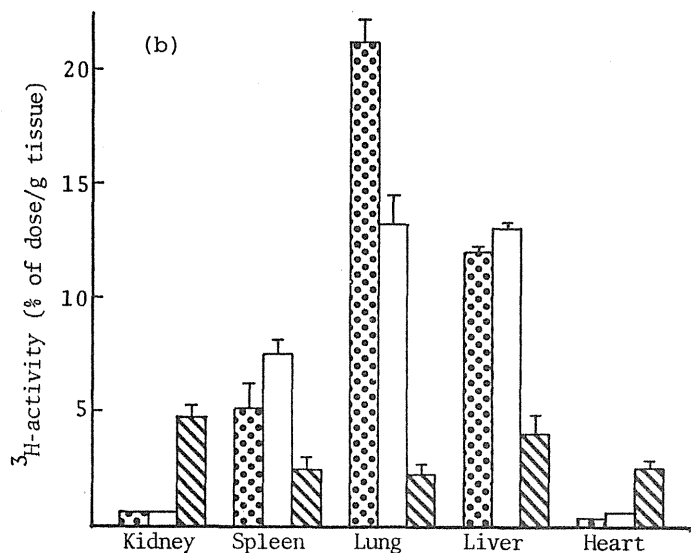
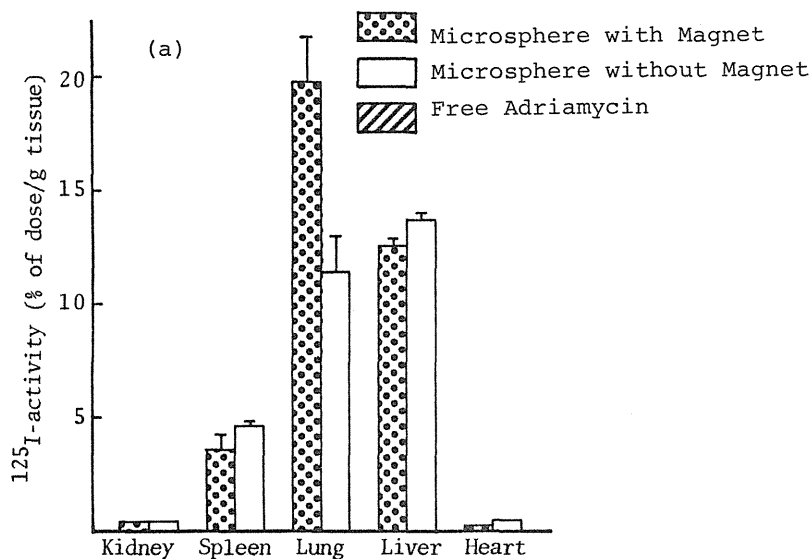


Fig. 55 Tissue Distribution of Radioactivity after Intravenous Injection of Magnetic ^{125}I -labeled Microsphere containing ^3H -labeled Adriamycin
Each column represents the mean \pm S.E. of 4 rats.

第 7 項 adriamycin 含有磁性小球体による抗腫瘍効果

ADM含有磁性小球体は徐放性を示し、かつ磁場によって肺中小球体量が増加することが明らかになったので、次にAH7974 移植肺癌ラットに磁性小球体を静脈内投与して抗腫瘍効果を調べた。

Fig.56の病理切片はAH7974 を接種後、1, 8 日に遊離ADM(300 μ g)、またはADM(300 μ g)を含有する磁性小球体(5 mg)を一回静注し、前項同様6000 Gの電磁石処理を10分を行い、接種後5 及び10日に肺を取り出し、ヘマトキシリン・エオシン染色したものである。第5 項で示した腫瘍ラット(接種後5 日, Fig.54 B)の肺に比べると、遊離薬物処理5 日(Fig.56 A)では、腫瘍部分は少なくなっており、白血球の浸潤が目立ち腫瘍自体も治癒過程であると考えられる。また正常ラットの肺(第5 項Fig. 54 A参照)に比べると血管外膜の浮腫が観察される。更に遊離薬物処理10日(Fig.56 B)では、腫瘍の集団性は更に少なくなっており、しかも変性していることがわかる。また血管壁の肥厚と血管外膜の浮腫が観察される。一方小球体処理5 日(同C)では腫瘍の集団性はなく、バラバラと認められ肺胞はきれいに観察される。A図に比べると小球体処理群の方が有効であることがわかる。また小球体処理10日(同D)では、肺胞内に浮腫がみられ、崩壊産物が存在している。B図に比べるとはるかに治療状態はよく、磁性小球体の抗腫瘍効果が遊離薬物群よりすぐれていることがわかる。

組織切片写真から明らかな様に、腫瘍の増殖は血管周囲にとどまらず、気管周囲や肺胞のいたるところで浸潤してゆくので、結果として肺重量が著しく増大すると考えられる。Fig.57は正常ラットと肺癌ラットの肺重量、及び肺癌ラットに1, 8, 15日と7日おきに3回ADM含有小球体を投与し、磁石処理した肺重量を比較したものである。図のDay 0は癌接種日を示し、5週令ラット(約150 g)で開始した。正常ラットの肺重量は、ゆるやかな上昇曲線を描いて増加し、実験開始時点で約0.7 gであったものが、15日後の7週令では約1.3 gとなった。しかしAH7974 細胞を静脈内移植すると、15日後では平均4.3 gにもなり、正常ラットの約3倍にも達した。一方ADM含有磁性小球体をDay 1に投与し、磁石処理することによって、この著しい癌細胞の増殖を抑えることが出来る。図から明らかな様に、Day 15における肺重量は平均2.4 gで正常ラットとの差は1.1 g程度である。未処理群の重量4.3 gとコントロール群の重量1.3 gの差3.0 gと比較すると約1/3になっており、癌の増殖が抑制されていることが認められ、磁性小球体の効果が明らかとなった。この効果は小球体からのADMの徐放性のコントロールと、磁石による肺への磁性小球体の選択性を更に増強させることによって、より高めること

が出来るであろう。

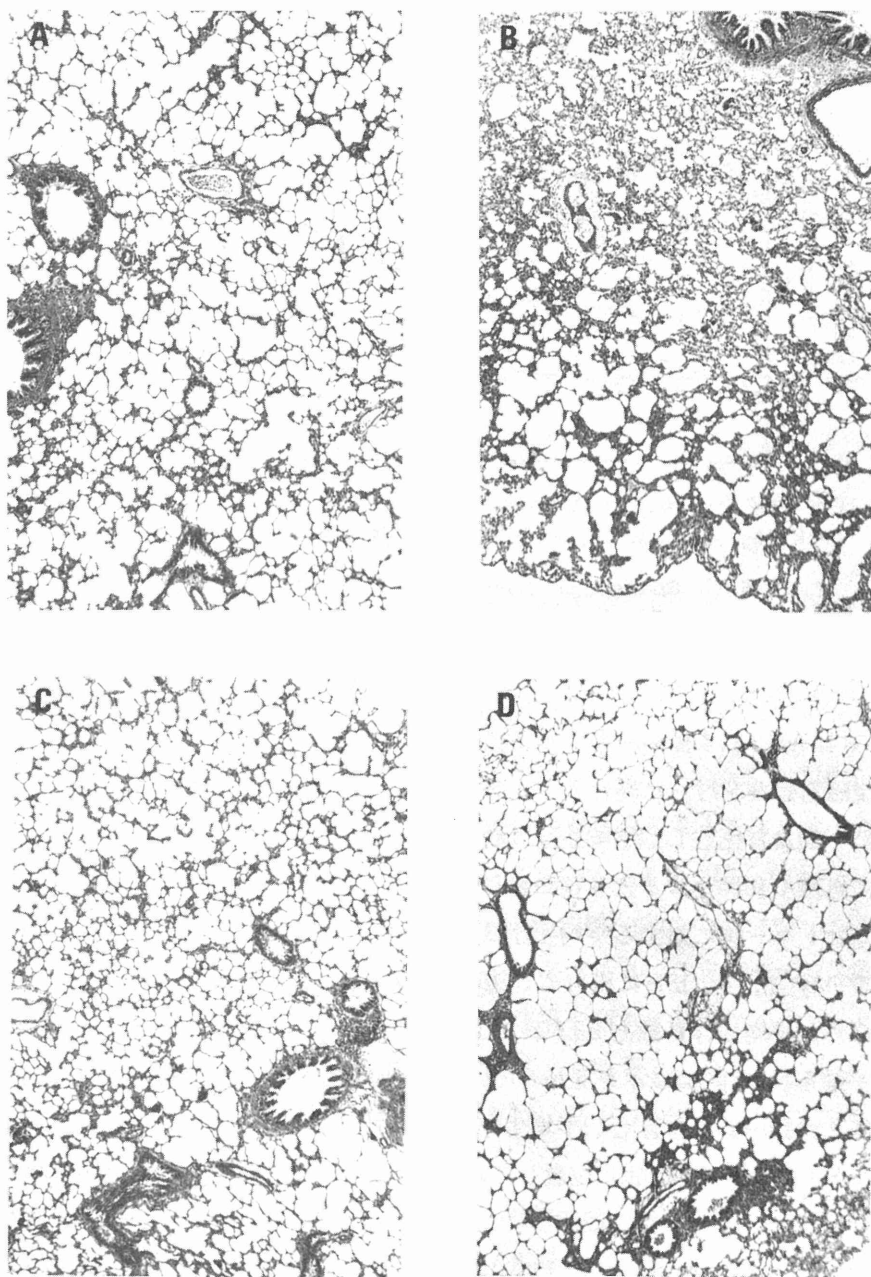


Fig. 56 Effect of Free or Magnetic Microsphere-entrapped
Adriamycin on AH 7974 Metastasized Lung
Day 5 (A) or 10 (B) after injection of free adriamycin,
Day 5 (C) or 10 (D) after injection of adriamycin-
entrapped magnetic microspheres (x 100)

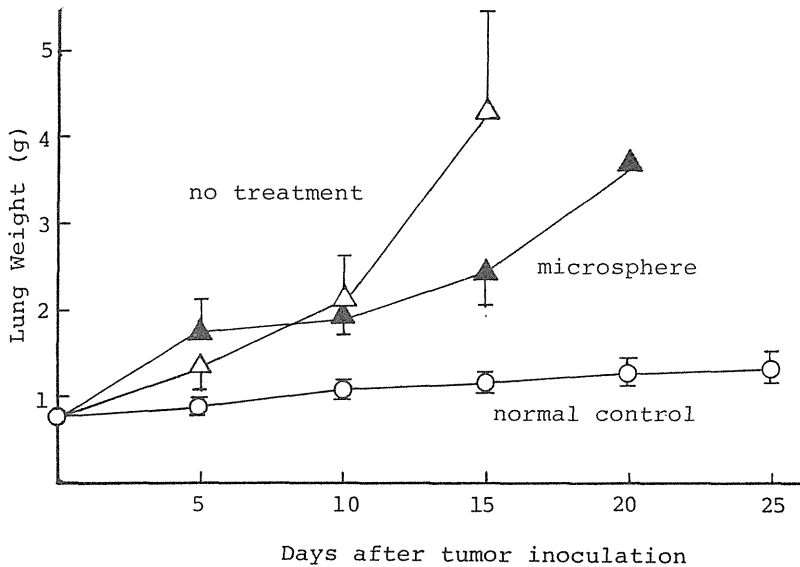


Fig. 57 Change in Lung Weight of AH 7974 Lung Cancer-bearing Rats

Each point represents the mean \pm S.E. of 5 rats.

Fig. 58 はAH7974 移植肺癌ラットに、未処理、遊離ADM処理、ADM含有磁性小球体投与後磁石処理を行った場合のラットの生存日数を示している。未処理（12匹）のラットは13～20日に死亡し、平均生存日数は16.4日であった。一方遊離ADMをDay 1, 8, 15に処理（10匹）すると生存日数は19～25日となり、平均生存日数は21.2日に増加し、コントロールに対する平均生存日数増加率T/C%は129%になった。更に磁性小球体をDay 1, 8, 15日に投与し、磁石をそれぞれ10分間適用すると生存日数は20～27日となり、平均生存日数も23.6日でT/C%は144%となって遊離ADM処理群より高い値が得られた。図には示さなかったが、磁性小球体を投与し、磁石処理しなかったもの（5匹）は15～23日生存し、平均生存日数は17.4日であった。この値は図中のコントロールとADM処理群の間に位置していた。磁石処理しなかった小球体が遊離ADMより低い効果であったことは、標的部位（肺癌部位）中の有効薬物量（小球体中に含有された薬物ではなく、遊離型として肺癌中に存在している薬物量）の差によって説明されるかもしれない。

また磁石処理の有無による生存率の差から、磁石による小球体分布の修飾を強めることによって肺癌ラットにおけるADMの抗腫瘍効果を更に増強させることが可能であると思われる。

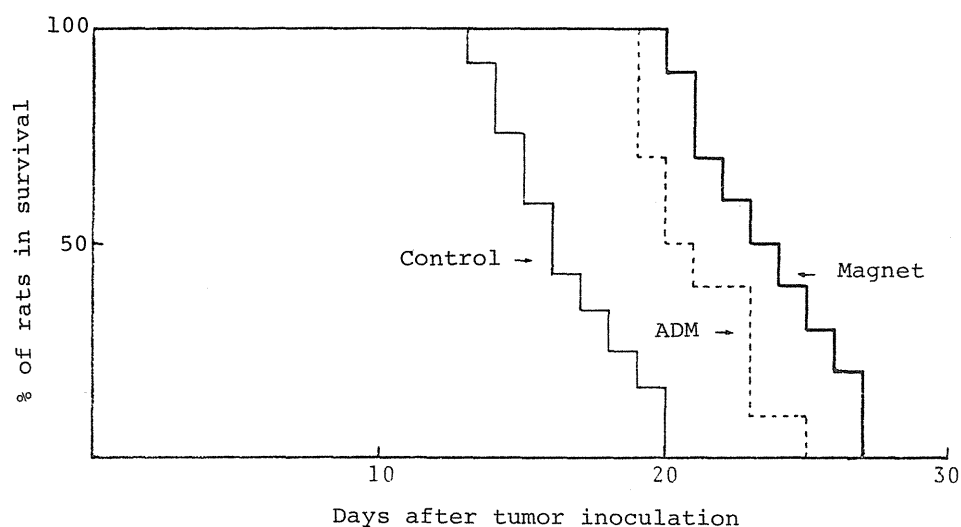


Fig. 58 Effect of Magnetic Microsphere-entrapped Adriamycin on the Survival of Rats Inoculated with AH 7974 Tumor Cells

第4節 小括と考察

マウスの肺及びラットの腎臓を標的部位として、磁性アルブミン小球体の磁気誘導による局在化の実験を行い、この薬物担体が十分磁気誘導されることを見出した。また磁性小球体に含有された薬物も標的部位に高濃度に局在することが明らかとなった。

磁性アルブミン小球体は、従来の drug carrier の標的性が carrier と生体系の物理化学的、または生物学的な特異的相互作用を利用するという点でその臨床応用が制限されるのに対して、物理的手段と非特異的相互作用を利用する点で、drug carrier の臨床治療における広汎な利用の道を開くものと考えられる。

AH7974 移植肺癌に対するADMの抗腫瘍効果は、肺中のADM量が多くかつ長時間滞留するほど強まると考えられる。

遊離ADMを静注すると薬物は主として肝臓と腎臓に高濃度に分布し、標的臓器である肺のADM濃度はそれらより低くなり、ADMの治療効果を十分に生じさせることにはならない。磁性小球体を静脈内投与すると、磁石を適用しない場合、ラット肺中の小球体濃度は $11.5\%/g$ tissue となり、また磁石の適用によって $19.7\%/g$ tissue まで増加する。更に磁性小球体に含有されたADM値も、コントロールで $13.4\%/g$ tissue なのに対し、磁石の適用によって 21.3% にも増加した。またこの値は遊離ADM投与時

の肺中濃度 2.5 % / g tissue (以上全て投与後10分の値)よりはるかに高く、以上のことより、AH 7974 移植肺癌に対する抗腫瘍効果の増強が期待された。

AH 7974 肺癌ラットの平均生存日数は未処理群で 16.4 日、遊離の ADM の投与により、それは 21.2 日に、また磁性小球体の投与と磁石適用によって 23.6 日まで延長し、磁性小球体投与による ADM の抗腫瘍効果の増強が明らかとなった。

磁石を適用しない場合の小球体投与時における肺の ADM 分布量は、遊離 ADM 投与時のそれより高いが、生存日数は反対に短くなっていた。これはおそらく腫瘍内の活性 ADM の濃度が小球体投与時低いことと関係していると思われ、ADM の抗腫瘍効果は、先にも述べたように腫瘍内濃度の高まりと、腫瘍に対する持続的放出の二つの因子が協同的に働かなくては十分な効果をあげることが出来ないものと思われる。

本章で述べた ADM 含有小球体の抗腫瘍効果は、磁性小球体に含有された ADM が磁気誘導によって標的部位である肺に高濃度に局在化し、そこで小球体から持続的に ADM が放出され、小球体近傍に存在する癌細胞に対して抗腫瘍効果を発揮したことによって生じたものと思われ、その抗腫瘍効果は組織学的検討からも十分認められたことであり、これらの事実は磁性アルブミン小球体の薬物担体としての有用性を強く示唆するものである。

しかしながら、標的臓器に局在した小球体量や抗腫瘍効果は、十分満足のいくものではない。この点については小球体に含有されるマグネタイト量や、適用する磁石の磁力の増加によって改善されるものと考えられ、⁷⁰⁾ これらの問題が解決した時、制癌剤を生体内で自由に誘導する選択的な癌化学療法が現実のものとなるであろう。

第 6 章

総括及び考察

以上、著者は五章にわたりアルブミン小球体の薬物担体としての有用性を検討し、以下の結論を得た。

1. アルブミン小球体の性質と一般的性質

制癌剤（5-FU及びADM）を含有したアルブミン小球体は、制癌剤－アルブミン混液を綿実油中で乳化（W/Oエマルジョン）し、熱固化して得た。小球体の粒子径、物理化学的性質は主に調製時の攪拌条件と固化温度によって決定されるが、一般に薬物の保持能力がすぐれ、乾燥状態では極めて安定であるので、アルブミン小球体は保存しやすい製剤であるといえる。

アルブミン小球体は過去スキャンニング剤としてすでに臨床でも応用されており、現在まで重篤な副作用の報告はなく、抗体産生能も非常に低いと考えられ、毒性のチェックはほぼ十分といえる。著者もマウスに多量（一匹あたり50mg）の小球体を腹腔内投与したが、顕著な毒性は観察されなかった。また小球体は蛋白分解酵素で分解が促進されるので、生体内で分解される（biodegradable）薬物担体であることが判明した。これらの結果から小球体は比較的安全な薬物担体であるといえる。

また5-FUとADM含有小球体は徐放性を示し、薬物放出は約一週間も持続する。更に Ehrlich 腹水癌 マウスに処理すると癌細胞に小球体の食作用が認められたことから、小球体に含有された薬物は、生体内において小球体から徐々に放出するものと、食作用等によって分解され、多量を一時に溶出するものと二種類の過程によって遊離してゆくものと考えられる。このような小球体からの活性薬物の遊離現象から薬効の持続化が期

待される。

これらアルブミン小球体の安定性と安全性並びに徐放性は、薬物担体としての条件を満足するもので、特にこの小球体が biodegradable な薬物担体であり、かつ Ehrlich 腹水癌の様な癌細胞に食作用によって取り込まれたことは注目に値することだと考えられる。食作用の機構については不明な点も多いが、ある種の癌細胞がアルブミン小球体を細胞内に取り込むという事実は、癌細胞の死を目的とした化学療法においては大きな意義をもつであろう。

2. アルブミン小球体の生体内分布

制癌剤は一般に副作用の強いものが多く、従って制癌剤は、腫瘍部位や腫瘍臓器のみに選択的に分布することが望まれる。しかしながら多くの制癌剤は、その物理化学的性質によって多少の違いはあるもののほぼ全身に分布する。制癌剤のこの欠点を補うためにも薬物担体が応用される。

マウスやラットにアルブミン小球体を静脈内注射すると、直径 $1\text{ }\mu\text{m}$ 以下の小球体では、小球体や含有薬物のほとんどが細網内皮系の発達している肝臓に取り込まれ、一方粒子径の大きいもの ($\geq 2\text{ }\mu\text{m}$) や固化温度の低いもの ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$) は肝臓より肺に局在化する傾向を示した。

しかしながら、Ehrlich 固型癌マウスに小球体を静脈内投与したところ、小球体は癌組織には分布せず、ほとんど肝臓に集中した。Ehrlich 癌は食作用が強く、腹水中の小球体を取り込んだといっても、この固型癌に必ずしも分布するとは限らず、肝臓中に小球体を取り込まれる前に、出来る限り多くの小球体が癌組織中の血管を通過するよう投与方法を考慮する必要がある。

しかし以上の結果から、アルブミン小球体の静脈内投与でも、肝臓や肺以外の臓器への制癌剤の副作用を著しく軽減することが明らかであるので、アルブミン小球体がこれら臓器の癌の治療において応用される可能性が見い出された。

3. Ehrlich 腹水癌及び固型癌に対する 5-fluorouracil

含有小球体の抗腫瘍効果

これらの結果をもとにして、次に担癌動物を使って抗腫瘍効果を検討した。まず Ehrlich 腹水癌及び固型癌マウスに 5-FU 含有小球体を腫瘍部位に、1 回投与（癌接種後

翌日)、並びに多数回投与(癌接種後1, 4, 9日)して抗腫瘍効果を検討した。その結果、腹水癌マウスに小球体を1回腹腔内投与すると、腹水中の5-FU量が遊離薬物投与時に比べ著しく高く、かつ持続した。また腹水液量や癌細胞数、並びに腫瘍の増殖による体重変化がコントロール群(生理食塩水、遊離5-FU処理)に比べ有意に低い値がえられた。担癌マウスの延命率も1回投与で21%、多数回投与で62%増加し、寛解動物(60日以上生存)もみられた。次にEhrlich固型癌マウスに小球体を腫瘍内投与すると小球体及び含有薬物のほとんどが腫瘍内にみられ、腫瘍の大きさもコントロール群に比べ有意に低い値(投与後20日: ほぼ1/10)を示した。

この様に、5-FU含有小球体が遊離薬物より高い抗腫瘍効果を示したことは、腫瘍部位における制癌剤レベルが持続したことに起因すると考えられる。アルブミン小球体からの薬物の放出は、小球体の固化温度などによりコントロール出来るので、癌細胞増殖速度⁷⁹⁾に応じた放出速度をもつ小球体の調製も可能となった。

4. AH7974転移肝癌に対する adriamycin 含有小球体の抗腫瘍効果

直径1 μm 以下の小球体は脈管内投与すると主に肝臓に取り込まれること、また徐放性でかつEhrlich担癌動物に対して持続的な抗腫瘍効果を示すことから、更に消化器癌手術時に特に問題になっている遊離癌細胞の門脈からの肝転移に注目し、動物モデルとしてラットAH7974細胞の門脈転移肝癌を作成し実験を行った。その結果、ADM含有小球体を門脈内投与すると小球体と含有薬物のほとんど全て(それぞれ ≈ 97 及び85% of dose)は肝臓に取り込まれ、延命率増加は50%、寛解動物も得られ、遊離薬物処理群に比べはるかに有効な値が得られた。

これらの結果から、胃癌を始めとする消化器癌手術時のadjuvant chemotherapyとしてアルブミン小球体が有用だと考えられる。また更には上記した門脈転移肝癌や肝血管肉腫、及び脈管系転移肺癌のある種の癌には、制癌剤含有小球体が有用であることが予想される。このように小球体の性状をよく理解し、工夫すれば巾広い癌に応用できるものと考ええる。

5. 磁性アルブミン小球体による臓器選択性の増強

これまでアルブミン小球体による標的性の増加を、担体である小球体と生体系との物理化学的または生物学的相互作用(例えば小球体の細網内皮系へのendocytosis)を

利用して述べて来たが、このことは標的部位が著しく制限されることになり、アルブミン小球体が薬物担体として癌の化学療法に広く応用されることを妨げることになる。そこで小球体の標的性を更に高める目的で、マグネタイトを含有させて磁気に感應する小球体を調製し、磁石によって強制的に体内分布を変化させた。

磁性小球体をマウスに静脈内投与すると、ほとんどの小球体は肝臓に集まる。しかし肺に磁石（3000 Gの永久磁石）を適用すると、肺中の小球体量は直径1 μm の小球体で3倍、3 μm の小球体で2倍に増加した。また1 μm の小球体をラットの腎動脈に投与し、磁石を左の腎臓に適用すると、左腎臓中の小球体量は投与量の約60%にも達し、右の腎臓（約1%）及び磁石のないコントロール群（約20%）に比べても著しく高い値を示した。

更にAH7974を静脈内に接種して作成した肺癌ラットにADM含有磁性小球体を投与して抗腫瘍効果を調べたところ、磁石（6000 Gの電磁石）によって延命率も44%増加し、磁石のないコントロール群（6%）や遊離ADM処理群（29%）に比べて高い値を示した。

この様に磁性小球体を使用することにより、薬物の体内分布を生体側の因子によらず、物理的手段（磁石による磁場の発生）によって制御でき、薬物の腫瘍部位への集中化（targeting）を可能にした。

なお本研究に用いたアルブミン小球体の原料には牛血清アルブミンを使用した。マウスやラットのモデル腫瘍を使った実験にも牛血清アルブミンを用いたが、ヒトに応用する場合は当然ヒト血清由来のアルブミンを用いるべきで、その点担体蛋白には使用動物種と同じ血清アルブミンを使って更に検討が必要と思われる。また、同種蛋白であったとしても熱変性した蛋白であるので、アルブミン小球体の抗体産生能が非常に低いと言われているものの、多数回投与時にはやはり注意が必要であろう。その他、調製小球体の品質管理の問題、小球体とヒトの癌との食作用の問題等、臨床応用に向けていくつかの検討課題が存在する。

しかし、これまで述べて来たように、アルブミン小球体は安定、安全で、制癌剤を含有した小球体が徐放性を示し、更には腫瘍部位選択性をもつことから、この薬物担体は制癌剤の治療効果を高めるという癌化学療法の目的にかなった1つの新しい方法を提供したものとする。

謝

辞

本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学加藤好夫教授、並びに森本雍憲助教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また種々の有益な御助言を戴いた岐阜薬科大学学長杉浦衛教授に深謝します。更に本研究に際し討論に参加して戴いた城西大学薬剤学教室灘井種一教授、宮崎正三助教授、岐阜薬科大学平野和行助教授に深謝すると共に、実験の一部に御協力戴いた秋元雅之修士、奥村睦男修士始め城西大学製剤学教室一同に感謝します。

- 1) G. Gregoriadis (ed.), "Drug Carriers in Biology and Medicine," Academic Press, Inc., London, 1979.
- 2) G. Gregoriadis, *Nature (London)*, **265**, 407 (1977).
- 3) D.A. Tyrrell, T.D. Heath, C.M. Colley, and B.E. Ryman, *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 259 (1976).
- 4) R.J. Juliano and D. Stamp, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 21 (1978).
- 5) H.K. Kimelberg, *Biochim. Biophys. Acta*, **448**, 531 (1976).
- 6) T. Tanaka, K. Taneda, H. Kobayashi, K. Okumura, S. Muranishi, and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3069 (1969).
- 7) G. Gregoriadis and B.E. Ryman, *Europ. J. Biochem.*, **24**, 485 (1972).
- 8) E. Mayhew, D. Papahadjopoulos, Y.M. Rustum, and C. Duve, *Cancer Res.*, **36**, 4406 (1976).
- 9) A. Trouet, D.D. Campeneere, C. De Duve, *Nature (London)*, **239**, 110 (1972).
- 10) A. Trouet, D.D. Campeneere, M.D. Smedt-Malengreaux, and G. Attassi, *Europ. J. Cancer*, **10**, 405 (1974).
- 11) R.A. Miller, J.M. Brady, and D.E. Cutright, *J. Biochem. Mater. Res.*, **11**, 711 (1977).
- 12) B.A. Rhodes, I. Zolle, J.W. Buchanan, and H.N. Wagner, jr., *Radiology*, **92**, 1453 (1969).
- 13) U. Scheffel, B.A. Rhodes, T.K. Natarajan, and H.N. Wagner, Jr., *J. Nucl. Med.*, **13**, 498 (1972).
- 14) H.N. Wagner, jr. and B.A. Rhodes, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **15**, 1 (1972).
- 15) S.S.L. Yang, E.L. Nickoloff, P.A. Maintyre, W.C. Maddrey, H.H. Mickesell, U. Scheffel, W. Kasecamp, and N.P. MacAllister, *J. Nucl. Med.*, **19**, 804 (1978).
- 16) P.A. Kramer and T. Burnstein, *Life Sci.*, **19**, 515 (1976).
- 17) P.A. Kramer, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1646 (1974).

- 18) K. Sugibayashi, Y. Morimoto, T. Nadai, Y. Kato, A. Hasegawa, and T. Arita, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 204 (1979).
- 19) B. Ng, S.M. Shaw, W.V. Kasseler, R.R. Landolt, G.E. Peck, *Can. J. Pharm. Sci.*, **15**, 30 (1980).
- 20) B.C. Rudy and B.Z. Senkowski, "Analytical Profile of Drug Substance," Vol. 5, ed. by K. Florey, Academic Press, Inc., New York, 1973, pp. 221-244.
- 21) M.G. Donelle, A. Martini, T. Colombo, A Bossi, and S. Garattini, *Europ. J. Cancer*, **12**, 913 (1976).
- 22) 根岸 嗣治, 高平 汎志, 薬誌, **93**, 1498 (1973).
- 23) P.A. Lewis, A.M. Symons, and R.J. Ancill, *J. Pharm. Pharmacol.*, **22**, 902 (1970).
- 24) O.H. Lowry, N.J. Rowerbrough, R.J. Rancill, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 25) B.A. Rhodes, H.S. Stern, J.W. Buchanan, I. Zolle, and H.N. Wagner, jr., *Radiology*, **99**, 613 (1971).
- 26) B.A. Rhodes and T.F. Bolles, "Radiopharmaceutics," eds. by C. Subramarian, J.F. Cooper, B.A. Rhodes, and V.J. Sodd, The Society of Nuclear Medicine, Inc., New York, 1975, pp. 282-291.
- 27) J. Szymendera, O. Mioduszezewska, I. Licinska, A. Czarnomska, and B. Luska, *J. Nucl. Med.*, **18**, 478 (1977).
- 28) R.W. Baker and H.K. Londale, "Controlled Release of Biological Active Agents," eds. by A.C. Tanquary and R.E. Lacey, Plenum Press, Inc., New York, 1974, pp 15-71.
- 29) D. Pitt, "Lysosomes and Cell Function," Longman, Inc., New York, 1975.
- 30) R.F. Gilfillian, *Cancer Res.*, **28**, 137 (1968).
- 31) I. Palyi, *Arch. Geswulstforsch*, **33**, 345 (1969).
- 32) M. Koishi, N. Fukuhara, and T. Kondo, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 804 (1969).
- 33) I. Zolle, B.A. Rhodes, and H.N. Wagner, jr., *Int. J. Appl. Radiat.*

Isotop., 21, 155 (1970).

- 34) D.O. Kubiatiowicz, D.S. Ithakissios, J.H. Wicks, and P.E. Heerwald, Heerwald, J. Nucl. Med., 19, 854 (1978).
- 35) K. Widder, G. Flouret, and A. Senyei, J. Pharm. Sci., 68, 79 (1979).
- 36) G. Knop, Ger. Patent 115037 (1975) [C.A., 86, 145921m (1977)].
- 37) R.R. Martodam, D.Y. Twumasi, I.E. Liener, J.C. Powers, N. Nishino, and G. Krejcarek, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 76, 2128 (1979).
- 38) K.J. Widder, A.E. Senyei, H. Ovadia, and P.Y. Paterson, Clin. Immunol. Immunopathol., 14, 395 (1979).
- 39) G. Gregoriadia, C.P. Swain, E.J. Wills, and A.S. Tavill, Lancet, 1, 1313 (1974).
- 40) A.P. De Leenheer, M.-C. Cosyns-Duyck, and P.M. Van Vaerenbergh, J. Pharm. Sci., 66, 1190 (1977).
- 41) N.R. Di Luzio and W.R. Wolles, Am. J. Physiol., 206, 939 (1964).
- 42) J. Thomas and S.N. Wiener, Int. J. Appl. Radiat. Isotop., 25, 463 (1974).
- 43) Y. Morimoto, M. Akimoto, K. Sugibayashi, T. Nadai, and Y. Kato, Pharmazie, 36, 155 (1981).
- 44) B. Clarkson, A. O'Conner, L. Winston, and D. Hutchison, Clin. Pharmacol. Ther., 5, 581 (1964).
- 45) M. Hawrylshyn, B.Z. Senkowski, and E.G. Wollish, Microbiochem. J., 8, 15 (1964).
- 46) K.V. Rao, K. Killion, and Y. Tancrikut, J. Pharm. Sci., 63, 1328 (1974).
- 47) N.K. Chaudhuri, B.J. Montag, and C. Heiderberger, Cancer Res., 18, 318 (1958).
- 48) K. Sugibayashi, Y. Morimoto, T. Nadai, and Y. Kato, Chem. Pharm. Bull., 25, 3433 (1977).
- 49) M. Kanke, G.H. Simmons, D.L. Weiss, B.A. Bivins, and P.P. DeLuca, J. Pharm. Sci., 69, 755 (1980).

- 50) K.W. Newton, Brit. J. Radiol., **38**, 224 (1965).
- 51) K. Sugibayashi, M. Akimoto, Y. Morimoto, T. Nadai, and Y. Kato, J. Pharm. Dyn., **2**, 350 (1979).
- 52) Y. Morimoto, M. Akimoto, K. Sugibayashi, T. Nadai, and Y. Kato, Chem Pharm. Bull., **28**, 3087 (1980).
- 53) C.G. Zubrod, Proc. Nat. Acad. Sci., **69**, 1042 (1972).
- 54) 下山正徳, 木村禧代二, "人癌細胞の培養", 大星章一, 菅野晴夫編, 朝倉, 東京, 1975, pp. 477-499.
- 55) 古江 尚, 太田和雄, 田口鉄男, 藤田 浩, 塚越 茂, "癌化学療法の基礎と臨床", 癌と化学療法社, 1977, pp. 11-36.
- 56) C. Heiderberger, L. Griesbach, B.J. Montag, D. Moorer, and O. Cruz, Cancer Res., **18**, 305 (1958).
- 57) T. Takahashi, S. Ueda, K. Kondo, and S. Majima, Cancer **38**, 1507 (1976).
- 58) I. Brawn and H.W.C. Ward, Cancer Lett., **2**, 227 (1977).
- 59) J. Freise, F.W. Schmidt, and P. Magerstedt, J. Cancer Res. Clin. Oncol., **94**, 21 (1979).
- 60) M. Hashida, S. Muranishi, H. Sezaki, N. Tanigawa, K. Satomura, and Y. Hikasa, Int. J. Pharm., **2**, 245 (1979).
- 61) M.J. Cline, "Cancer Chemotherapy," W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1971, pp. 1-205.
- 62) R.G. Hahn, C.G. Moertel, A.J. Schutt, and H.W. Bruckner, Cancer, **35**, 1031 (1975).
- 63) Y. Morimoto, K. Sugibayashi, and Y. Kato, Chem. Pharm. Bull., **29**, 1433 (1981).
- 64) 佐藤 博, 市村宏子, 日本臨床, **29**, 170 (1971).
- 65) 根岸嗣治, 高平汎志, 基礎と臨床, **7**, 73 (1973).
- 66) G. Bonadonna, S. Monfardini, M. Deluna, and F. Fossati-Bellani, Brit. Med. J., **3**, 503 (1969).

- 67) A. Mimran and D. Casellas, *Plfänger Arch.*, **382**, 233 (1979).
- 68) Y. Morimoto, K. Sugibayashi, M. Okumura, and Y. Kato, *J. Pharm. Dyn.*, **3**, 264 (1980).
- 69) J.N. Weinstein, R.L. Magin, M.B. Yatvin, and D.S. Zahrko, *Science*, **204**, 188 (1979).
- 70) 加藤哲郎, 癌と化学療法, **8**, 698 (1981)
- 71) K.J. Widder, A.E. Senyei, and Scarpelli, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **58**, 141 (1978).
- 72) 松村雄介, マシンデザイン, **1977**, 77.
- 73) 下飯坂潤三, 中塚勝人, 中鉢良治, 佐藤惟陽, 日化, **1976**, 6.
- 74) 亘理勉, 渡辺哲敏, 磁性体の医学への応用シンポジウム, 東京, 1970年2月
- 75) 戸部満寿夫, 小林和雄, 鈴木幸子, 池口良雄,
磁気の医学への応用シンポジウム, 埼玉県理化学研究所, 1972年4月.
- 76) Y. Morimoto, M. Okumura, K. Sugibayashi, and Y. Kato, *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 624 (1981).
- 77) 佐藤博, 医学と薬学, **4**, 589 (1980).
- 78) R.L. Dedrick, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **1**, 435 (1974).
- 79) J.E. Holland and E. Frei (eds.), "Cancer Medicine," Lea & Febiger, Philadelphia, 1973.